

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 10 月 7 日 (07.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/085641 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/00, A01H 5/00 Yusuke) [JP/JP]; 〒3050854 茨城県つくば市上横場字石居 1894-8 中村ハイ ツ 102 Ibaraki (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/002563
- (22) 国際出願日: 2004 年 3 月 2 日 (02.03.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2003-080847 2003 年 3 月 24 日 (24.03.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人国際農林水産業研究センター (JAPAN INTERNATIONAL RESEARCH CENTER FOR AGRICULTURAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒3058686 茨城県つくば市大わし 1-1 Ibaraki (JP). 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構 (INCORPORATED ADMINISTRATIVE AGENCY, NATIONAL AGRICULTURE AND BIO-ORIENTED RESEARCH ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒3058517 茨城県つくば市観音台 3-1-1 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 篠崎 和子 (SHINOZAKI, Kazuko) [JP/JP]; 〒3050031 茨城県つくば市吾妻 2 丁目 11-807-508 Ibaraki (JP). 桂 幸次 (KATSURA, Koji) [JP/JP]; 〒3050035 茨城県つくば市松代 1-4-17 ジュネス 1 205 Ibaraki (JP). 伊藤 裕介 (ITO,
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目 17 番 1 号 虎ノ門 5 森ビル 3 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: STRESS-INDUCED PROMOTER AND METHOD OF USING THE SAME

(54) 発明の名称: ストレス誘導性プロモーター及びその利用方法

(57) Abstract: A stress-induced promoter efficaciously acting in monocotyledons such as rice; and an environmental stress-tolerant plant using the promoter. Namely, a rice-origin promoter comprising the following DNA (a) or (b): (a) a DNA consisting of a base sequence represented by SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:10; (b) a DNA hybridizable with a DNA consisting of a base sequence complementary to a base sequence represented by SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:10 under stringent conditions and having a stress-induced promoter activity; and an environmental stress-tolerant plant having the above-described promoter transferred thereinto.

(57) 要約: 本発明は、イネ等の単子葉植物で有効に機能するストレス誘導性プロモーター、及び該プロモーターを用いた環境ストレス耐性植物に関する。すなわち、本発明は、以下の(a)又は(b)のDNAからなる、イネ由来のプロモーター: (a) 配列番号 1 又は配列番号 10 で表される塩基配列からなるDNA (b) 配列番号 1 又は配列番号 10 で表される塩基配列からなるDNAに相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつストレス誘導性のプロモーター活性を有するDNA、及び、前記プロモーターを導入した環境ストレス耐性植物に関する。

## 明 細 書

## ストレス誘導性プロモーター及びその利用方法

## 5 技 術 分 野

本発明は、イネ由来のストレス誘導性プロモーターとその利用方法に関する。

## 背 景 技 術

- 10 植物は、乾燥、高温、凍結、塩など、自然界における様々な環境ストレスに対応するための耐性機構を有している。最近では、こうしたストレス耐性機構が分子レベルで明らかになるにつれ、バイオテクノロジー的手法を用いたストレス耐性植物も作出されるようになってきた。例えば、ストレスを受けた細胞内には LEA タンパク質、水チャネルタンパク質、適合溶
- 15 質合成酵素などのストレスタンパク質が誘導され、細胞をストレスから防御する。そこで、オオムギの LEA タンパク質やタバコの detoxification enzyme 等の遺伝子、浸透圧調節物質(糖、プロリン、グリシンペタイン等)合成酵素の遺伝子を植物に導入する研究が試みられた。また、細胞膜脂質の修飾酵素であるシロイヌナズナの w-3 fatty acid desaturase やらん藻
- 20 の D9desaturase の遺伝子等を用いた研究も試みられた。これらの研究では、いずれも一つの遺伝子がカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターに結合して植物に導入された。しかし、組換え植物のストレス耐性度が不安定であったり、導入遺伝子の発現レベルが低い等の問題から実用化に至ったものはなかった。
- 25 一方、ストレス耐性機構には複数の遺伝子が複雑に関与することがわかってきた(非特許文献1)。そこで、それらの発現を同時に活性化する転写因子の遺伝子を恒常的プロモーターに連結して導入し、植物のストレス耐性を高める研究も試みられた(非特許文献2)。しかし、複数の遺伝子が同時期に活性化されると、宿主植物のエネルギーが該遺伝子産物の生成や、
- 30 該遺伝子産物に起因する細胞内代謝に向けられるため、植物自体の成長が

遅れたり矮化してしまうという問題があった。

これに対し、発明者らはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) からストレス応答性エレメントに結合し、該エレメント下流の遺伝子の転写を特異的に活性化する転写因子をコードする遺伝子、DREB1A、DREB1B、DREB1C、  
5 DREB2A、DREB2B を単離した (特許文献 1)。そして、これらの遺伝子をストレス誘導性 rd29A プロモーターに連結して植物に導入することにより、矮化しないストレス耐性植物が作製できることを報告した (特許文献 2)。

しかし、双子葉植物であるシロイヌナズナ由来の rd29A プロモーターは、単子葉植物中で機能はしてもその活性が弱い。したがって、単子葉植物に  
10 おいて強い活性を有するストレス誘導性プロモーターが望まれていた。

[特許文献 1] 特開 2000-60558 号公報

[特許文献 2] 特開 2000-116260 号公報

[非特許文献 1] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K., Plant Physiol. (1997) Oct;115 (2) p327-334

15 [非特許文献 2] Liu et al., The Plant Cell, (1998) 10:p1391-1406

## 発 明 の 開 示

本発明は、イネ等の単子葉植物において効果的に機能し得るストレス誘導性プロモーターを見出し、該プロモーターを用いて新規な環境ストレス  
20 耐性植物を提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討した結果、イネゲノムより、強いストレス誘導性プロモーターを単離することに成功した。そして、該プロモーターを用いれば、単子葉植物の環境ストレス耐性を著しく向上させることが可能であることを見出し、本発明を完成させた。

25 すなわち、本発明はイネ由来のストレス誘導性プロモーターに関する。該プロモーターは、具体的には以下の (a) 又は (b) の DNA からなる。

(a) 配列番号 1 又は配列番号 10 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 1 又は配列番号 10 で表される塩基配列からなる DNA に相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズ  
30 し、かつストレス誘導性のプロモーター活性を有する DNA

ここで、ストレスとは、乾燥ストレス、低温ストレス又は塩ストレスである。

また、本発明は前記プロモーターを含む組換えベクターを提供する。該ベクターは、本発明のプロモーター支配下に他の構造遺伝子や調節遺伝子を含んでいてもよく、特にストレス耐性を向上させる構造遺伝子及び／又は調節遺伝子を含んでいることが好ましい。

ストレス耐性を向上させる構造遺伝子の好適な例としては、プロリン合成の鍵酵素 P5CS 遺伝子 (Yoshida Y. et al (1999) BBRC 261)、ガラクトキシル合成遺伝子 AtGalS3 遺伝子 (Taji T. et al (2002) Plant J. 29 : 417-426) が挙げられる。

また、ストレス耐性を向上させる調節遺伝子の好適な例としては、シロイヌナズナ由来転写因子 DREB 遺伝子 (特開 2000-60558 号公報)、イネ由来転写因子 OsDREB 遺伝子 (特願 2001-358268、Dubouzet et al Plant J. in press)、及び植物ホルモン ABA の生合成の鍵酵素 NCED 遺伝子 (Iuchi S. et al (2001) Plant J. 27 : 325-333) 等が挙げられる。

特に、シロイヌナズナ由来転写因子 DREB 遺伝子、イネ由来転写因子 OsDREB 遺伝子が好ましく、イネ由来転写因子 OsDREB 遺伝子が最も好ましい。

さらに、本発明は本発明のベクターを適当な宿主に導入して得られる形質転換体を提供する。ある態様において、該形質転換体は本発明のベクターを宿主植物に導入して得られるトランスジェニック植物である。この場合、宿主植物としては単子葉植物が望ましく、単子葉植物としてはイネが望ましい。

さらにまた、本発明は、本発明のプロモーターを植物に導入することにより、該植物のストレス耐性を向上させる方法を提供する。本発明のプロモーターは単子葉植物において従来にない強いストレス誘導性プロモーター活性を有するため、単子葉植物のストレス耐性の向上により適している。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、各ストレス負荷時における a0022 (LIP9) のノザン解析結果を示

す。

図 2 は、a0022 (LIP9) のプロモーター領域の塩基配列を示す。

図 3 は、Gus 発現用コンストラクトの構造を示す。

(T<sub>g7</sub>: g7 ターミネーター、HPT: ハイグロマイシン フォスフォトランス  
5 フェラーゼ、P<sub>Nos</sub>: Nos プロモーター、T<sub>Nos</sub>: Nos ターミネーター)

図 4 は、各種プロモーターに GUS 遺伝子を連結して導入した形質転換タバコ又はイネにおける、乾燥ストレス負荷時の GUS 活性を示すグラフである。

図 5 は、LIP9 プロモーターに GUS 遺伝子を連結して導入した形質転換イ  
10 ネにおける、塩ストレス負荷時の GUS 染色結果を示す写真である。

図 6 は、形質転換イネと野性株における、導入遺伝子及び各標的遺伝子 (LIP9 (a0022)、WSI724 (a0066)、salT (a2660) の発現量をノザン法で比較した結果である。図中 a、b、c はそれぞれそれぞれ形質転換体のラインを示す。

15 図 7 は、a0066 (WSI724) のプロモーター領域の塩基配列を示す。

図 8 は、WSI724 プロモーターに GUS 遺伝子を連結して導入した形質転換イネにおける、乾燥ストレス負荷時の GUS 活性を示すグラフである (右: 乾燥ストレス負荷、左: コントロール)。

図 9 は、WSI724 プロモーターに GUS 遺伝子を連結して導入した形質転換  
20 イネにおける、乾燥ストレス負荷時の GUS 染色結果を示す写真である。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願 2 0 0 3 - 8 0 8 4 7 号の明細書に記載された内容を包含する。

## 25 発明を実施するための最良の形態

本発明のプロモーターは、低温、乾燥、塩などの環境ストレスに対して特異的に誘導されるイネ由来のプロモーターである。

### 1. 本発明のプロモーターの同定

本発明のプロモーターは、ストレスを負荷した植物個体と負荷しない植物  
30 個体間で、その発現が著しく異なる遺伝子 (ストレス誘導性遺伝子) を

スクリーニングし、次いでゲノム情報から該遺伝子のプロモーターと考えられる配列をスクリーニングすることにより同定することができる。

以下、本発明のプロモーターを同定するプロセスについて説明する。

#### 1. 1 mRNA の調整

- 5      まず、ストレス誘導性遺伝子をスクリーニングするための、mRNA を調製する。

mRNA の供給源としては、葉、茎、根、花など植物体の一部又は全体のいずれであってもよい。また、植物体は、その種子を GM 培地、MS 培地、#3 培地などの固体培地に播種し、無菌条件下で生育させた植物体を用いてもよいし、カルスや無菌条件下で育てた植物体の培養細胞を用いてもよい。

- 本スクリーニングでは、ストレスを負荷した植物個体と負荷しない植物個体との間での遺伝子発現量の相違を比較するため、mRNA は前記両個体のそれぞれについて調整する必要がある。ストレスの負荷方法は、用いる植物によって適宜設定される。一般には、乾燥ストレスは、2～4 週間、水を与えず育てることにより負荷することができる。また低温・凍結ストレスは、15～-10℃で、1～10 日間育てることにより負荷することができる。さらにまた、塩ストレスは 100～600mM NaCl で 1 時間～7 日間育てることにより負荷することができる。例えば、イネの場合であれば、水耕栽培で生育させたイネを、低温ストレスなら 10～-4℃、塩ストレスなら 150～250mM NaCl、乾燥ストレスなら脱水状態等に暴露する。

- 25      ストレスを負荷した植物個体と負荷しない植物個体は、それぞれ液体窒素で凍結し、乳鉢などで摩砕後、得られた摩砕物から、グリオキサール法、グアニジンチオシアネート-塩化セシウム法、塩化リチウム-尿素法、プロテインアーゼ K-デオキシリボヌクレアーゼ法などにより粗 RNA 画分を抽出する。次いで、この粗 RNA 画分から、オリゴ dT-セルロースやセファロース 2B を担体とするポリ U-セファロースなどを用いたアフィニティーカラム法、あるいはバッチ法によりポリ (A)<sup>+</sup>RNA (mRNA) を得る。必要であれば、さらにショ糖密度勾配遠心法などにより mRNA を分画して用いてもよい。

#### 1. 2 ストレス誘導性遺伝子のスクリーニング

- 30      ストレス誘導性遺伝子のスクリーニングは、ストレスを負荷した植物個

- 体と負荷しない植物個体間で、その遺伝子発現量の相違を比較することにより行う。遺伝子発現量の比較方法は、特に限定されず、例えば、RT-PCR 法、リアルタイム PCR 法、サブトラクション法、ディファレンシャル・ディスプレイ法、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーション法、又はク
- 5   ロスハイブリダイゼーション法等の公知の方法を用いることができる。

なかでも、遺伝子チップ、cDNA マイクロアレイ等の固相試料を用いた方法は、数千～数万の遺伝子の発現を、定性的かつ定量的に、一度で検出することが可能という点で、前記スクリーニングの実施に好適である。

(1) cDNA マイクロアレイの調製

- 10   前記スクリーニングに用いる cDNA マイクロアレイは、プロモーターの検出対象である単子葉植物（例えばイネ）の cDNA がスポットされているものであれば特に限定されず、既成のものを用いてもよいし、公知の方法に基づいて作製してもよい（例えば、The Plant Cell (2001) 13 : 61-72 Seki et al 参照）。

- 15   cDNA マイクロアレイの作製には、まず目的とする植物の cDNA ライブラリーの調製が必要である。cDNA ライブラリーは、(1)の方法に従って調製した mRNA を鋳型として、公知の方法により作製することができる。スポットする cDNA は単子葉植物由来のものであれば特に限定されないが、後のゲノムデータベースの解析の利便性からイネ等のゲノム解析が進んだ単子葉
- 20   植物のものが好ましい。植物は平常状態（無処理）の植物でもよいが、好ましくは乾燥、塩、低温等のストレスに暴露した植物である。

- cDNA ライブラリーの作製では、まず市販のキット (ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE 社製) 等) を用いて、mRNA を逆転写して一本鎖 cDNA を合成し、これを鋳型として二本鎖 cDNA を合成する。次いで、得られた二本鎖
- 25   cDNA に適切な制限酵素切断部位を含むアダプターを付加した後、ラムダファージベクターのクローニング部位に挿入する。これを市販のキット（例えば、Gigapack III Gold packaging extract (STRATAGENE 社製) 等) を用いて in vitro パッケージングし、宿主大腸菌に感染・増幅すれば、目的とする cDNA ライブラリーが得られる。

- 30   cDNA ライブラリーが作製されたら、この cDNA、あるいは該 cDNA のうち

特異性の高い部分（例えば、3'側の反復配列を含まないUTR領域）をPCR増幅し、アレイ固定用プローブを作製する。この作業を繰り返して目的とする全ての遺伝子のプローブが調製できたら、これらを市販のスポッター（例えば、Amersham社製など）を用いてスライドガラス上にスポッティングする。かくして、目的とするcDNAマイクロアレイが得られる。

## (2) 遺伝子発現量の検出

cDNAマイクロアレイによる遺伝子発現量の検出は、サンプルmRNA（或いはcDNA）を適当な試薬でラベルし、これをアレイ上のcDNAプローブとハイブリダイズさせたときのシグナル強度として測定することができる。遺伝子の発現量は、通常アレイ上にスポットされたcDNAプローブ量のばらつきを考慮し、適当なコントロールとの比較値、あるいは比較する2サンプル間の発現量比として求めることが望ましい。本スクリーニングの場合であれば、ストレスを負荷しない無処理の植物由来のmRNAをコントロールとして、ストレスを付加した植物由来のmRNAの相対的発現量を検出すればよい。

検出は、コントロールとサンプルのmRNA（あるいはそのcDNA）を、それぞれ異なる蛍光色素（例えば、Cy3とCy5）でラベルし、アレイ上のcDNAプローブと共にハイブリダイズさせることにより行う。例えば、ストレスを負荷した個体よりmRNAを抽出し、Cy5標識dCTP存在下逆転写してCy5標識cDNAを調製する。次に、ストレスを負荷しない無処理の個体よりmRNAを抽出し、同様の方法でCy3標識cDNAを調製する。Cy5標識cDNA（サンプル）とCy3標識cDNA（コントロール）を等量ずつ混合し、アレイ上のcDNAとハイブリダイズさせる。なお、標識用色素はサンプルにCy3を、コントロールにCy5を利用してもよいし、その他の適当な標識試薬を用いてもよい。

得られた蛍光強度を蛍光シグナル検出機で読み取り、数値化すれば、この値はコントロールに対するサンプルの遺伝子発現量比に相当する。スキナーで読み取った蛍光強度は必要に応じて、誤差の調整や各試料毎のばらつきの正規化を行ってもよい。正規化は、ハウスキーピング遺伝子等各サンプルで共通に発現している遺伝子を基準に行うことができる。さらに、



信頼性限界ラインを特定して、相関性の低いデータを除いてもよい。

### (3) ストレス誘導性遺伝子の選択

5     ストレス誘導性遺伝子は、上記アレイによる解析の結果、ストレスを負荷した植物個体と負荷しない植物個体との間で発現量が著しく異なる遺伝子として特定される。ここで、「著しく異なる」とは、例えば、インテンシティー 1000 以上で、両者の発現量が少なくとも 3 倍以上異なることを意味する。

### (4) ノザン・ブロッティングによる発現解析

10     こうして選択された遺伝子は、さらにノザン解析等により、ストレス誘導性に当該遺伝子の発現が高まることを確認する。例えば、前述した方法で、様々なレベルの塩、乾燥、温度等のストレスに植物を暴露する。そして、該植物から RNA を抽出し、これを電気泳動にかけて分離する。分離された RNA はニトロセルロース膜に転写し、前記遺伝子に特異的な標識 cDNA プローブとハイブリダイゼーションさせれば、その発現量を検出することが  
15     できる。

   選択された遺伝子が、ストレス依存的に発現が向上していれば、該遺伝子はストレス誘導性であることが確認できる。こうして、イネ cDNA ライブラリーより選択されたストレス誘導性遺伝子の例として、本発明にかかる a0022 (LIP9 : 配列番号 2) 及び a0066 (WSI724 : 配列番号 8) を挙げる  
20     ことができる。なお、a0022 及び a0066 はマイクロアレイ上に固定されている cDNA の ID No. である。

## 1. 3 プロモーター配列のスクリーニング

### (1) 遺伝子データベースからの推定

   次に、既存の遺伝子データベース（例えば、DDBJ のデータベース等）を  
25     基に検索ソフト（例えば、Blast 等）を用いてストレス誘導性遺伝子のプロモーター配列を検索する。イネのように、ほとんどのゲノムが解読されている植物では、特定されたストレス誘導性遺伝子を支配するプロモーター配列の探索は既存のデータベースを用いてすべて可能となる。プロモーター配列は、ゲノム上で前記ストレス誘導性遺伝子（cDNA）と相同性の高い  
30     ゲノム遺伝子上流領域から、プロモーターと考えられる領域として選

ばれる。例えば、ストレス誘導性遺伝子のゲノム情報に基づき、これらの遺伝子の開始コドンと推定される位置から約 1 ～ 2 kb 上流付近をプロモーター領域と推定する。

- ところで、公知のストレス誘導性プロモーターの中には、その配列中に
- 5 該プロモーター活性に関わるシスエレメント；例えば、乾燥ストレス応答性エレメント (DRE ; dehydration-responsive element)、アブシジン酸応答性エレメント (ABRE ; abscisic acid responsive element)、低温ストレス応答性エレメントなど、
- を有するものがある。このシスエレメントにストレス誘導性の転写因子が
- 10 結合すると、前記プロモーターが活性化され、その支配下にあるストレス耐性付与遺伝子を発現させる。したがって、検索した上流領域に前記シスエレメントが含まれていれば、その領域はストレス誘導性プロモーターである可能性が非常に高いといえる。

- かくして、前述の a0022 (LIP9 : 配列番号 2) と相同性が高い遺伝子の
- 15 ゲノム情報が得られ、その 1.1kb 上流領域より推定 LIP9 プロモーター配列 (配列番号 1) がスクリーニングされた。同様にして、a0066 (WSI724 : 配列番号 8) と相同性が高い遺伝子上流領域より推定 WSI724 プロモーター配列 (配列番号 10) がスクリーニングされた。

## (2) ストレス誘導性プロモーターの機能確認

- 20 次に推定プロモーター配列について、ストレス負荷時における該プロモーター活性の変化により、その機能の確認を行う。

- まず、前項で推定されたプロモーター配列を基にプライマーを作製し、ゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、プロモーターのクローニングを行う。
- 次に、該プロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結して作製したレポータープラスミドを植物に導入し、該植物 (好ましくはその  $T_1$  世代) のス
- 25 トレス負荷時におけるレポーターの発現を調べる。なお、レポーターとしては、例えば  $\beta$  グルクロニダーゼ (GUS : pBI121, Clontech 社等)、ルシフェラーゼ遺伝子、緑色蛍光タンパク質遺伝子等が挙げられるが、活性が数値で与えられること、染色によって発現が視覚的に観察できるという点で
- 30 GUS が好ましい。

#### 1. 4 本発明のプロモーター

以上の結果、イネゲノム由来の LIP9 プロモーター配列(配列番号 1)は、乾燥、低温、塩等の各ストレス依存的に高い発現を示すストレス誘導性プロモーターであることが確認された。

5 このように、LIP9 プロモーターはすべてのストレスに対して特異的に誘導されるプロモーターである。以下にその構造的、機能的特徴を挙げる。

1) LIP9 プロモーターは、その構造中に乾燥ストレス誘導に関与するシスエレメント DRE を 2 つ含む (図 2 参照)。

2) LIP9 プロモーターは、シスエレメント DRE に結合してその下流の遺伝子の転写を活性化させるイネ由来の転写因子：OsDREB1 遺伝子 (特願 10 2001-358268 号) の過剰発現体で高発現している。

3) LIP9 プロモーターには OsDREB1 遺伝子が結合する DRE 配列が存在することから OsDREB 遺伝子の過剰発現の最適プロモーターであることが予測される。

15 一方、WSI724 プロモーターも、その構造中に DRE 配列が 2 つ含まれていること、及び a0066 のストレス負荷時の発現パターン (乾燥、塩、低温誘導性で、低温による誘導性が乾燥、塩に比べて遅い) から、OsDREB 遺伝子のターゲットになっていることが予想された。

20 なお、本発明のプロモーターは配列番号 1 又は配列番号 10 で示される塩基配列を有する DNA に限定されず、配列番号 1 又は配列番号 10 で表される塩基配列からなる DNA に相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズしうる DNA も、ストレス誘導性プロモーター活性を有する限り、本発明のストレス誘導性プロモーターに含まれる。ここで、ストリンジェントな条件とは、ホルムアミド濃度が 30~50%、37  
25 ~50℃、6×SSC の条件、好ましくはホルムアミド濃度が 50%、42℃、6×SSC の条件をいう。

#### 2. 組換えベクター

本発明の組換えベクターは、本発明のプロモーターを含むベクターである。該ベクターは、本発明のプロモーターの下流に他の構造遺伝子又は調節遺伝子を機能しうる態様で含んでいてもよい。そのような遺伝子の好適  
30

な例は、ストレス耐性を向上させる構造遺伝子及び／又は調節遺伝子である。なお、「機能しうる態様」とは、他の構造遺伝子又は調節遺伝子が本発明のプロモーターの支配下で適切に発現されるような態様を意味する。

ここで、ストレス耐性を向上させる構造遺伝子とは、乾燥ストレス、低温ストレス又は塩ストレス等の環境ストレスに対する植物の耐性を高める機能を担うタンパクをコードする遺伝子であって；例えば、LEA タンパク質、水チャネルタンパク質、適合溶質合成酵素、タバコの detoxification enzyme、浸透圧調節物質(糖、プロリン、グリシンベタイン等)合成酵素、細胞膜脂質の修飾酵素であるシロイヌナズナの w-3 fatty acid desaturase、らん藻の D9desaturase の遺伝子、プロリン合成の鍵酵素である P5CS、ガラクチノール合成遺伝子 AtGolS3 遺伝子を挙げることができる。

また、ストレス耐性を向上させる調節遺伝子とは、ストレス誘導性プロモーターの活性や、ストレス耐性を付与する遺伝子の発現を調節することにより、植物のストレス耐性を向上させる遺伝子であって；例えば、シロイヌナズナ由来の転写因子：DREB1A、DREB2A、DREB1B、及び DREB1C 遺伝子(特開 2000-60558 号公報参照)、イネ由来の転写因子：OsDREB1A、OsDREB1B、OsDREB1C、OsDREB1D、及び OsDREB2A 遺伝子(特願 2001-358268 号)、ならびに植物ホルモン ABA の生合成の鍵酵素である NCED 遺伝子等を挙げることができる。

特に、本発明のプロモーターが特定のシスエレメントを含む場合は、該シスエレメントに結合し、そのプロモーター活性を向上させる転写因子の遺伝子を、プロモーター下流に連結させることが好ましい。

前述のように、本発明にかかる LIP9 プロモーターはその構造内に DRE 配列を 2 つ含む。したがって、LIP9 プロモーターの下流に連結させる遺伝子としては、DREB 遺伝子又は OsDREB 遺伝子(例えば、OsDREB1A、OsDREB1B、OsDREB1C、OsDREB1D、OsDREB2A 遺伝子、OsDREB2B 遺伝子)が好ましく、特に OsDREB 遺伝子が最も好ましい。

また、WSI724 プロモーターも DRE 配列を 2 つ含み、OsDREB のターゲットになっていることが予想されていることから、その下流に連結させる遺伝子としては、DREB 遺伝子又は OsDREB 遺伝子(例えば、OsDREB1A、OsDREB1B、

OsDREB1C、OsDREB1D、OsDREB2A 遺伝子、OsDREB2B 遺伝子) が好ましく、特に OsDREB 遺伝子が最も好ましいと考えられる。

本発明のベクターは、適当なベクターに本発明のプロモーターあるいは、該プロモーターと他の調節遺伝子や構造遺伝子を機能しうる態様で連結  
5 (挿入) して構築される。プロモーターを挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えばプラスミド DNA、ファージ DNA などが挙げられる。プラスミド DNA としては、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119 などの大腸菌宿主用プラスミド、pUB110、pTP5 などの枯草菌用プラスミド、YEp13、YEp24、YCp50 などの酵母宿主用プラスミド、pBI221、  
10 pBI121 などの植物細胞宿主用プラスミドなどが挙げられる。又はジ DNA としては入ファージなどが挙げられる。さらに、レトロウイルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスをベクターとして用いてもよい。

本発明のプロモーターのベクターへの挿入は、精製された DNA を適当な  
15 制限酵素で切断し、これをベクターの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入して連結すればよい。

本発明の組換えベクターは、さらに、所望によりスプライシングシグナル、ポリ A 付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列 (SD 配列) などを含有してもよい。なお、選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉  
20 酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子などを用いることができる。

### 3. 形質転換体

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、プロモーター活性が発現し得る態様で宿主中に導入することにより構築することができる。  
25 ここで、宿主は本発明のプロモーターが機能しうるものであれば特に限定されないが、植物が好ましく、特にイネ等の単子葉植物がより好ましい。

植物や植物細胞を宿主とする場合、例えばイネ、トウモロコシ、コムギ、シロイヌナズナ、タバコ、ニンジンなどから株化した細胞や該植物から調製したプロトプラストが用いられる。植物への組換えベクターの導入方法  
30 としては、Abel らのポリエチレングリコールを用いる方法 [Abel, H. et al.

Plant J. 5:421-427 (1994)]やエレクトロポレーション法などが挙げられる。

#### 4. ストレス耐性トランスジェニック植物

##### (1) トランスジェニック植物の作製

- 本発明のプロモーターの支配下に、ストレス耐性を向上させる構造遺伝子及び／又は調節遺伝子を機能しうる態様で連結して植物に導入することにより、環境ストレス、特に、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレスなどに対して抵抗性が向上されたトランスジェニック植物を作出することができる。宿主植物としては、特に単子葉植物が好ましい。

- 植物宿主への本発明のプロモーター等の導入方法としては、アグロバクテリウム感染法などの間接導入法や、パーティクルガン法、ポリエチレングリコール法、リボソーム法、マイクロインジェクション法などの直接導入法などが挙げられる。従来、イネのような単子葉植物では、アグロバクテリウム感染法を用いたトランスジェニック植物の作製は困難といわれてきたが、アセトシリングンを加えることによってアグロバクテリウムがイネに感染可能となり、単子葉植物においても利用可能となってきた。

以下にアグロバクテリウムを用いたトランスジェニック植物の作製について説明する。

- まず、本発明のプロモーターとストレス耐性を向上させる構造遺伝子及び／又は調節遺伝子とを含む DNA を適当な制限酵素で切断後、必要に応じて適切なリンカーを連結し、植物細胞用のクローニングベクターに挿入して植物導入用組換えベクターを作製する。クローニング用ベクターとしては、pBI2113Not、pBI2113、pBI101、pBI121、pGA482、pGAH、pBIG 等のバイナリーベクター系のプラスミドや pLGV23Neo、pNCAT、pMON200 などの中間ベクター系のプラスミドを用いることができる。

- バイナリーベクター系プラスミドを用いる場合、上記のバイナリーベクターの境界配列 (LB, RB) 間に、目的遺伝子を挿入し、この組換えベクターを大腸菌中で増幅する。次いで、増幅した組換えベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンズ C58、LBA4404、EHA101、C58C1Rif<sup>R</sup>、EHA105 等に、凍結融解法、エレクトロポレーション法等により導入して、植物への形質導入用に用いる。

上記の方法以外に、三者接合法 [Nucleic Acids Research, 12 : 8711 (1984)] によっても植物導入用アグロバクテリウムを調製することができる。すなわち、目的遺伝子を含むプラスミドを保有する大腸菌、ヘルパープラスミド (例えば pRK2013 など) を保有する大腸菌、及びアグロバク  
5 テリウムを混合培養し、リファンピシリン及びカナマイシンを含む培地上で培養して植物導入用の接合体アグロバクテリウムを得ることができる。

植物体内で外来遺伝子などを発現させるためには、構造遺伝子の後に、植物用のターミネーターなどを配置させる必要がある。本発明において利用可能なターミネーター配列としては、例えばカリフラワーモザイクウイル  
10 ルス由来やノパリン合成酵素遺伝子由来のターミネーターなどが挙げられる。但し、植物体内で機能することが知られているターミネーターであればこれらのものに限定されるものではない。

さらに、効率的に目的の形質転換細胞を選択するために、有効な選択マーカー遺伝子を使用することが好ましい。その際に使用する選択マーカー  
15 としては、カナマイシン耐性遺伝子 (NPTII)、抗生物質ハイグロマイシンに対する抵抗性を植物に付与するハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ (hpt) 遺伝子及びピアラホス (bialaphos) に対する抵抗性を付与するホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ (bar) 遺伝子等から選ばれる  
1 つ以上の遺伝子を使用することができる。本発明のプロモーター及び選  
20 択マーカー遺伝子は、単一のベクターと一緒に組み込んでも良いし、それぞれ別個のベクターに組み込んだ 2 種類の組換え DNA を用いてもよい。

こうして調製したアグロバクテリウムを採取した植物切片に感染させれば、目的とするトランスジェニック植物が作製できる。

トランスジェニック植物は、適切な抗生物質を加えた培地に播種し、目  
25 的のプロモーターや遺伝子を保有する個体を選択する。選択された個体は、ボンソル 1 号や黒土等の入った鉢に植え替えてさらに生育させる。一般に、導入遺伝子は宿主植物のゲノム中に同様に導入されるが、その導入場所が異なることにより導入遺伝子の発現が異なるポジションイフェクトと呼ばれる現象が見られる。そこで、プローブとして導入遺伝子の DNA 断片を用  
30 いたノザン法で検定することによって、より導入遺伝子が強く発現してい

る形質転換体を選抜することができる。

## (2) ストレス耐性の確認

本発明のプロモーターやストレス耐性を向上させる構造遺伝子及び／又は調節遺伝子が、トランスジェニック植物及びその次世代に組み込まれて  
5 いることの確認は、これらの細胞及び組織から常法に従って DNA を抽出し、PCR 法又はサザン分析等を用いて導入した遺伝子を検出することにより行うことができる。

また、トランスジェニック植物における導入遺伝子の発現レベル及び発現部位の分析は、該植物の細胞及び組織から常法に従って RNA を抽出し、  
10 RT-PCR 法又はノザン解析を用いて導入した遺伝子の mRNA を検出することにより行うことができる。あるいは、導入した遺伝子の転写産物を、抗体を用いたウエスタン分析等により直接、分析してもよい。

本発明のプロモーターを導入したトランスジェニック植物の環境ストレスに対する耐性は、例えばパーミキュライト、パーライト、ボンソルなど  
15 を含む土を入れた植木鉢にトランスジェニック植物を植え、或いは水耕栽培を行い、各種環境ストレスを負荷した場合の生存を調べることによって評価することができる。環境ストレスとしては、低温、乾燥、塩等が挙げられる。例えば、乾燥ストレスに対する耐性は、2～4 週間、水を与えずその生存を調べることにより評価することができる。また低温・凍結ストレス  
20 に対する耐性は、15～-10℃に、1～10 日間おいた後、2 日～3 週間、20～35℃で生育させその生存率を調べることにより評価することができる。また、塩ストレスは 100～600mM NaCl で 1 時間～7 日間おいた後、1～3 週間、20～35℃で生育させその生存率を調べることにより評価することができる。かくして、本発明のプロモーターを用いれば、植物（特に単子葉植物）  
25 を矮化させることなくそのストレス耐性を著しく向上させることができる。

## (3) トランスジェニック植物の好適な例

本発明にかかるトランスジェニック植物の好適な例として、LIP9 あるいは WSI724 プロモーター支配下に OsDREB 遺伝子を機能しうる態様で連結したベクターをイネ、コムギ等の単子葉植物に導入したトランスジェニック  
30



植物を挙げることができる。LIP9 プロモーターには DRE 領域が 2 つ含まれているため、OsDREB 遺伝子は該シスエレメントに結合することにより、効果的にそのストレス耐性効果を示すことができる。同様に、WSI724 プロモーターにも DRE 領域が 2 つ含まれているため、OsDREB 遺伝子の発現を高めて、植物のストレス耐性を向上させることができる。

## 実施例

以下、実施例により本発明について具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

### 10   〔実施例 1〕 イネのストレス誘導性遺伝子の同定

cDNA マイクロアレイとノザン解析により、イネのストレス誘導性遺伝子を探索した。

#### 1. イネ cDNA マイクロアレイの作製

2 ～ 3 週間水耕栽培したイネ（日本晴）をそれぞれ乾燥、塩、低温処理を行った。乾燥処理は室温で風乾し、塩処理は 250mM の NaCl 溶液で栽培し、低温処理は 4℃ で栽培した。各ストレス処理を行ったイネは液体窒素で凍結後、グアニジンチオシアネート-塩化セシウム法により全 RNA を抽出し、Oligo(dt)-cellulose カラムを用いて mRNA を調製した。得られた mRNA を鋳型にして、HybriZAP-2.1 two-hybrid cDNA Gigapack cloning kit

15   （STRATAGENE 社製）を用いて cDNA を合成し、HybriZAP-2.1 ファージミドベクターの EcoRI-XhoI 切断部位に挿入し、クローニングした。このファージミド DNA を Gigapack III Gold packaging extract（STRATAGENE 社製）を用いてパッケージングした。得られた、cDNA を含むラムダファージ粒子を宿主大腸菌に感染させ増幅した後、ファージ懸濁液として回収した。

25   上記 cDNA クローンの塩基配列をシーケンスして約 1500 個の独立したクローンを選抜した。選抜したクローンを PCR 法で増幅させ、GTMASS System（Nippon Laser and Electronic Laboratory）を用いて、poly-L-lysine-coated マイクロスライドガラス（model S7444 ; Matsunami）にスタンピングした後、UV クロスリンクによって固定し、イネ cDNA マイクロアレイを作製した（The Plant Cell（2001）13 : 61-72 Seki et al）。

30

## 2. マイクロアレイ解析

前項と同様の乾燥、塩、低温の各ストレス処理、又は 100  $\mu$ M のアブシジン酸処理 (5 時間又は 10 時間) を行ったイネ、ならびに無処理のイネの各々から mRNA を精製した。無処理のイネ由来の mRNA をコントロール、各ストレス又はアブシジン酸処理したイネ由来の mRNA をサンプルとして、それぞれ Cy3、Cy5 を用いた二蛍光標識法を用いて、cDNA マイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析の結果、インテンシティー：1000 以上で、コントロールに比較して 3 倍以上の発現量が認められた遺伝子をストレス誘導性遺伝子の候補として選択した。かくして、a0022 (LIP9：配列番号 2) 及び a0066 (WSI724：配列番号 8) がストレス誘導性遺伝子として選択された。

## 3. ノザンハイブリダイゼーションによる発現解析

前項で選択された遺伝子の発現特性をノザンハイブリダイゼーションにより解析した。まず、イネをアブシジン酸、乾燥、低温、塩、水の各ストレスに暴露し、それぞれ 0, 1, 2, 5, 10 時間ごとにサンプリングした。なお、アブシジン酸、乾燥、低温、塩ストレスは、1. と同様の方法で付与し、水ストレスは純水に浸すことにより付与した。それぞれのサンプルから全 RNA を調製し、電気泳動を行い、ノザン法により各遺伝子の発現を見た。結果を図 1 に示す。

図 1 から明らかなように、a0022 はアブシジン酸、乾燥、低温、塩の各ストレスにより発現が誘導され、特にアブシジン酸、乾燥、塩では早い時間帯に発現の上昇がみられ、低温では遅いに時間帯に発現の上昇がみられた。また、a0066 は、そのストレス負荷時の発現パターン (乾燥、塩、低温誘導性で、低温による誘導性が乾燥、塩に比べて遅い) から OsDREB のターゲットになっていることが予想された。

### 〔実施例 2〕プロモーター配列の解析

#### 1. イネゲノムデータベースのスクリーニング

実施例 1 でストレス誘導性遺伝子として選択された cDNA：a0022 (LIP9：配列番号 2) について、DDBJ のイネゲノムデータベースを利用し、blast

により相同部位の検索を行った。その結果、相同性が認められた遺伝子の開始コドンから 5' 側に向かって、1.1kb 上流の配列をプロモーター配列(配列番号 1) として選択した。また、a0066 (WSI724: 配列番号 8) についても同様の検索を行い、そのプロモーター配列(配列番号 10) が選択された。

図 2 に LIP9 のプロモーター領域の構造を示す。図 2 から明らかなように、LIP9 はその構造中に 2 ヶ所のシス配列 DRE ((A/G) CCGAC) を持つことが確認された。また、図 7 に WSI724 のプロモーター領域の構造を示す。WSI724 プロモーターについても、その構造中に 2 ヶ所のシス配列 DRE ((A/G) CC GAC) を持つことが確認された。

## 2. クローニング

選択されたプロモーター配列を基にプライマーを設計し、イネのゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、クローニングを行った。用いたプライマー配列及び PCR 条件は以下のとおりである。

15 LIP9 プロモーター用プライマー配列:

Forward primer: 5'-CACGAAGCTTTCATCAGCTATTCATCAA-3' (配列番号 3)

Reverse primer: 5'-CCGGATCCTCGATCGATGGATTCAGCTA-3' (配列番号 4)

WSI724 プロモーター用プライマー配列:

Forward primer: 5'-CCATTGGATCCAGCCGTGGAAGTCCAAC-3' (配列番号 11)

20 Reverse primer: 5'-GCCGGGGATCCTTGGCGCCTCTCTCTCT-3' (配列番号 12)

PCR 条件: 95 度 1 分 55 度 1 分 68 度 2 分 30 サイクル

## 〔実施例 3〕 ストレスに対する LIP9 プロモーター活性

### (1) トランスジェニック植物の作製

25 pBIG29APHNot のプロモーター部位をトウモロコシのユビキチンプロモーターに置換して作られた G-ubi プラスミドを BamHI-HindIII で切断し、同様に切断した LIP9 プロモーターの断片と連結した。LIP9 プロモーターを組み込んだプラスミドを BamHI-EcoRI で切断し、同様に pBI221(Clontech) を BamHI-EcoRI で切断し切り出した Gus 遺伝子と連結し  
30 Gus 発現コンストラクト (G-LIP9:GUS) を作製した (図 3)。プラスミド

G-LIP9:GUS を、培養後 10% glycerol で洗浄したアグロバクテリウム EHA105 にエレクトロポレーション法によって導入し、アグロバクテリウム EHA105 (G-LIP9:GUS) を作製した。このアグロバクテリウム EHA105 (G-LIP9:GUS) を以下のようにしてイネに感染させ、形質転換体を作製した。

イネの種子を 70%エタノールで 1 分浸漬し、さらに 2%次亜塩素酸ナトリウムに 1 時間浸漬することにより滅菌し、次いで滅菌水により水洗後、N6D 固形培地 (1 リットル当たり: CHU [N6] Basal Salt Mixture (Sigma 社製) 3.98g、スクロース 30g、ミオイノシトール 100mg、カザミノ酸 300mg、L-プロリン 2878mg、グリシン 2mg、ニコチン酸 0.5mg、ピリドキシン塩酸 0.5mg、チアミン塩酸 1mg、2,4-D 2mg、ゲルライト 4g、pH 5.8) のプレートに 9 粒ずつ播種し、24 日間培養してカルスを誘導した。形成された種子約 20 粒分のカルスを、新たな N6D 固形培地に移植し、さらに 3 日間培養した。

一方、上記アグロバクテリウム EHA105 (G-LIP9:GUS) を 5ml のリファンピシリン 100mg/l、及びカナマイシン 20mg/l を含む YEP 培地 (1 リットル当たり: Bacto peptone 10g、Bacto yeast extract 10g、NaCl 5g、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  406mg、pH 7.2) で 28℃で 24 時間培養した。このアグロバクテリウムを 20mg/l のアセトシリゴンを含む AAM 培地 (1 リットル当たり:  $MnSO_4 \cdot 5H_2O$  10mg、 $H_3BO_3$  3mg、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  2mg、 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  250  $\mu$ g、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  25  $\mu$ g、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  25  $\mu$ g、KI 750  $\mu$ g、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  150mg、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  250mg、Fe-EDTA 40mg、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  150mg、ニコチン酸 1mg、チアミン塩酸 10mg、ピリドキシン塩酸 1mg、ミオイノシトール 100mg、L-アルギニン 176.7mg、グリシン 7.5mg、L-グルタミン 900mg、アスパラギン酸 300mg、KCl 3g、pH 5.2) で 0. D. <sub>600</sub> が 0.1 になるようにうすめ、20ml のアグロバクテリウム懸濁液を作製した。

つぎに、前述の 3 日間培養したカルスにアグロバクテリウム懸濁液を加え、1 分間混合した。その後このカルスを滅菌したペーパータオルに置き、余分なアグロバクテリウム懸濁液を除去した後、滅菌した濾紙を敷いた 2N6-AS 固形培地 (1 リットル当たり: CHU [N<sub>6</sub>] Basal Salt Mixture 3.98g、スクロース 30g、グルコース 10g、ミオイノシトール 100mg、カザミノ酸

- 300mg、グリシン 2mg、ニコチン酸 0.5mg、ピリドキシン塩酸 0.5mg、チアミン塩酸 1mg、2, 4-D 2mg、アセトシリゴン 10mg、ゲルライト 4g、pH 5. 2) の上で 25℃ 3 日間、暗黒下で培養した。3 日間の培養後、カルベニシリン 500mg/l を含む 3%スクロース水溶液で白濁しなくなるまで十分に洗浄し、
- 5 カルベニシリン 500mg/l 及びハイグロマイシン 10mg/l を含んだ N6D 固形培地上で 1 週間培養した。その後カルベニシリン 500mg/l 及びハイグロマイシン 50mg/l を含んだ N6D 固形培地に移植して、18 日間培養した。さらにこのカルスを再分化培地 (1 リットル当たり:ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 (日本製薬社製) 4. 6g、スクロース 30g、ソルビトール 30g、カザミノ酸 2g、ミオイノシトール 100mg、グリシン 2mg、ニコチン酸 0. 5mg、ピリドキシン塩酸 0. 5mg、チアミン塩酸 0. 1mg、NAA 0. 2mg、カイネチン 2mg、
- 10 カルベニシリン 250mg、ハイグロマイシン 50mg、アガロース 8g、pH 5. 8) に移植した。1 週間ごとに新しい培地に移植し直し、再分化して芽が 1cm 程度に生長したものはホルモンフリー培地 (1 リットル当たり:ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 (日本製薬社製) 4. 6g、スクロース 30g、グリシン 2mg、ニコチン酸 0. 5mg、ピリドキシン塩酸 0. 5mg、チアミン塩酸 0. 1mg、
- 15 ハイグロマイシン 50mg、ゲルライト 2. 5g、pH 5. 8) に移植した。ホルモンフリー培地上で 8cm 程度に生長した植物体を合成粒状培土ボンソル 1 号 (住友化学社製) を入れた植木鉢に移し、形質転換植物体の種子を得た。
- 20 同様にして、rd29A プロモーター (Nature Biotechnology (1999) 17, 287-291)、又は 35S プロモーター、salT プロモーター (配列番号 5) を GUS 遺伝子上流に結合したコンストラクトを作製し、イネ及び／又はタバコに導入した。

- なお、salT プロモーターは、LIP9 プロモーターと同様のスクリーニング
- 25 によってイネゲノム中より単離されたストレス誘導性プロモーターである。salT プロモーターに対応するマイクロアレイ上の cDNA の ID No. は、a2660 である。salT プロモーターは、その構造中に特別なシス配列はもたないが、アブシジン酸、乾燥、低温、塩の各ストレスにより発現が誘導されることが確認されている (特願 2002-377316 号参照)。

- 30 (2) 乾燥ストレスに対するプロモーター活性

得られた GUS 発現形質転換イネの  $T_1$  世代は 2 週間水耕栽培し、実施例 1 と同様にして乾燥ストレスに暴露した。

Gus 発現形質転換タバコの場合、 $T_1$  世代は再生してきた植物体をプラントコーン内で 3 ~ 5 週間生育させ、生長した葉を 2 等分し、一方をコントロールとし片方を室温で風乾し乾燥ストレスに暴露した。

各形質転換イネ及びタバコについて、4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide の分解による蛍光強度の変化から GUS 活性を測定した。図 4 に、乾燥ストレス負荷時における各種プロモーター導入形質転換植物の GUS 活性を示す。

図 4 から明らかなように、単子葉植物であるイネでは、rd29A プロモーターよりも salt プロモーターや LIP9 プロモーターがより強いストレス誘導性を示した。特に、LIP9 プロモーターは salt の約 2 倍という、強い活性を示した。LIP9 プロモーターは双子葉植物であるタバコでもストレス誘導性プロモーター活性を示したが、イネに比較してその活性は弱かった。

### (3) 塩ストレスに対するプロモーター活性

次に、LIP9 プロモーター-GUS コンストラクト導入イネの植物体全体を塩水に浸し、GUS 染色を行ったところ、植物体全体が染色された (図 5)。このことから、LIP9 プロモーターは、ストレスを負荷された植物体全体で機能することが確認された。

### 〔実施例 4〕ストレスに対する WSI724 プロモーター活性

実施例 3 と同様にして、WSI724 プロモーターで形質転換したイネを作製し、そのストレス耐性を確認した。

#### (1) トランスジェニック植物の作製

pBIG29APHSNot のプロモーター部位をトウモロコシのユビキチンプロモーターに置換して作られた G-ubi プラスミドを BamHI-HindIII で切断し、同様に切断した WSI724 プロモーターの断片と連結した。WSI724 プロモーターを組み込んだプラスミドを BamHI で切断して末端を平滑化した後、pBIG ベクターの SmaI で切断した部位に連結して GUS 発現コンストラクト (WSI724:GUS) を作製した。次いで、プラスミド WSI724:GUS を、培養後 10%

glycerol で洗浄したアグロバクテリウム EHA105 にエレクトロポレーション法によって導入し、アグロバクテリウム EHA105 (WSI724:GUS) を作製した。このアグロバクテリウム EHA105 (WSI724:GUS) をイネに感染させ、形質転換体を作製した。

5 (2) 乾燥ストレスに対するプロモーター活性

得られた GUS 発現形質転換イネを実施例 3 と同様にして乾燥ストレスに暴露し、4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide の分解による蛍光強度の変化から GUS 活性を測定した。その結果、乾燥ストレスを負荷（切り取って 24 時間放置）した形質転換イネの葉では、コントロール（切り取って  
10 すぐに凍結）の葉に比較して、高い GUS 活性が認められた。また、乾燥ストレス（24 時間）負荷後の形質転換イネを GUS 染色したところ、根と葉の両方で GUS 活性が認められた。

15 [実施例 5] 形質転換イネ中の導入遺伝子と LIP9 及び WSI724 遺伝子の発現

実施例 3 と同様にして、トウモロコシのユビキチンプロモーター、又は 35S プロモーター支配下に OsDREB1A 遺伝子（配列番号 6）又は DREB1C 遺伝子（配列番号 8）をイネに導入した形質転換体を作製した。そして、形質転換体の導入遺伝子 OsDREB1A 及び DREB1C と、導入遺伝子が発現を変化  
20 させたと考えられる LIP9 (a0022)、WSI724 (a0066)、salT (a2660) の mRNA レベルをノザン解析により調べた。

プローブとしては、OsDREB1A 遺伝子（配列番号 6）、DREB1C 遺伝子（配列番号 7）、LIP9 遺伝子（a0022：配列番号 2）、WSI724 遺伝子（a0066：配列番号 8）、salT 遺伝子（a2660：配列番号 9）を用いた（配列番号 6、7 については、配列表中の各コーディング領域の配列をプローブとして使用）。  
25 なお、コントロールとして、ベクターのみを形質転換したイネを同様に解析した。

形質転換イネは、5 日間 30mg/ml ハイグロマイシンを含む 0.1%ベンレーート溶液中で選抜した後、ボンソル 1 号の入った鉢に植え替えて 12 日間育てた。野性株も同様に育てた。各植物から全 RNA を調製して、電気泳動を  
30

行い、実施例 1 と同様にノザン法で各遺伝子の発現を見た。結果を図 6 に示す。図中、a、b、c はそれぞれ形質転換体のラインを示す。

この結果、OsDREB1A、DREB1C 遺伝子を導入された形質転換イネでは、プロモーター領域に DRE 配列を持つ LIP9 の発現は誘導されたが、プロモーター領域に DRE 配列を持たない salT の発現は導入遺伝子 (OsDREB1A や DREB1C) の発現と一致しなかった。また、LIP9 と同様にプロモーター領域に DRE 配列を持ち、OsDREB のターゲットになっていると予想されている WSI724 遺伝子の発現も、これら形質転換体で誘導された。

LIP9 や WSI724 プロモーター上には DRE 配列が存在し、OsDREB1A 遺伝子の過剰発現体では LIP9 遺伝子や WSI724 遺伝子が高発現している。LIP9 や WSI724 は OsDREB1A をはじめとする OsDREB 遺伝子の標的遺伝子と考えられ、したがって LIP9 や WSI724 プロモーターは OsDREB 遺伝子を過剰発現するための最適なプロモーターと推定された。

〔参考例 1〕 pBE35S:OsDREB1A, G-ubi:OsDREB1A 及び G35S- Sh $\Delta$ :OsDREB1A の作製

まず、G-ubi, G35S- Sh $\Delta$  は以下のように作製した。まず pBIG プラスミド (Nucleic Acids Research 18: 203 (1990)) を BamHI で切断・平滑化処理した後、連結して BamHI 切断部位をつぶし、さらに HindIII と EcoRI で切断した。この断片と pBE2113Not プラスミドを同様に切断して得られる約 1.2kb の断片とを連結して、pBIG2113Not プラスミドを作製した。

つぎに pBIG2113Not を HindIII と BamHI で切断し、同様に切断された rd29A プロモーターの断片 (約 0.9kb, Nature biotechnology 17: 287-291 (1999)) と連結して、pBIG29APHSNot プラスミドを作製した。さらにこの pBIG29APHSNot プラスミドを HindIII と SalI で切断後、同様に切断されたトウモロコシのユビキチン遺伝子 (Ubi-1) のプロモーターの断片 (約 2.0kb, Plant Molecular Biology 18: 675-689 (1992)) 又は p35S-sh $\Delta$ -stop の CaMV 35S プロモーターとトウモロコシのスクロースシンターゼ遺伝子 (Sh1) のイントロンの一部を含んだ断片 (約 1.6kb, Proceeding National Academy of Science USA 96: 15348-15353 (1999)) と連結して G-ubi プラス



ミド又は G35S- Sh $\Delta$  プラスミドを作製した。

前記 pBE2113Not, G-ubi 及び G35S- Sh $\Delta$  はそれぞれ BamHI で切断した後、同様に切断したイネの転写因子をコードする OsDREB1A 遺伝子断片と ligation high (東洋紡社製) を用いて連結し、得られた連結物により大腸菌 DH5  $\alpha$  を形質転換した。形質転換体を培養後、該培養物からプラスミド pBE35S:OsDREB1A, G-ubi:OsDREB1A 及び G35S- Sh $\Delta$ :OsDREB1A をそれぞれ精製した。次いで、これらの塩基配列を決定し、OsDREB1A 遺伝子がセンス方向に結合したものを選抜した。

上記のプラスミド pBE35S:OsDREB1A を持つ大腸菌 DH5  $\alpha$  とヘルパープラスミド pRK2013 を持つ大腸菌 HB101 及びアグロバクテリウム C58 を共に、LB 寒天培地を用いて 28℃ で 24 時間混合培養した。生成したコロニーを掻き取り、1ml の LB 培地に懸濁した。この懸濁液 10  $\mu$ l をリファンピシリン 100mg/l、及びカナマイシン 20mg/l を含む LB 寒天培地に塗布し、28℃ で 2 日間培養して、接合体アグロバクテリウム C58 (pBE35S:OsDREB1A) を得た。一方上記のプラスミド G-ubi:OsDREB1A と G35S- Sh $\Delta$ :OsDREB1A のプラスミドを、培養後 10% glycerol で洗浄したアグロバクテリウム EHA105 にエレクトロポレーション法によって導入し、アグロバクテリウム EHA105 (G-ubi:OsDREB1A) とアグロバクテリウム EHA105 (G35S- Sh $\Delta$ :OsDREB1A) をそれぞれ得た。

20

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

#### 産業上の利用の可能性

25 本発明によれば、単子葉植物において有効に機能しうるストレス誘導性プロモーターが提供される。該プロモーターは DRE 配列を含み、したがって、その支配下に OsDREB 遺伝子等を連結して植物に導入すれば、イネ等の単子葉植物において、強いストレス耐性トランスジェニック植物を作出することができる。

30

配列表フリーテキスト

配列番号 3 ー人工配列の説明：プライマー

配列番号 4 ー人工配列の説明：プライマー

配列番号 1 1 ー人工配列の説明：プライマー

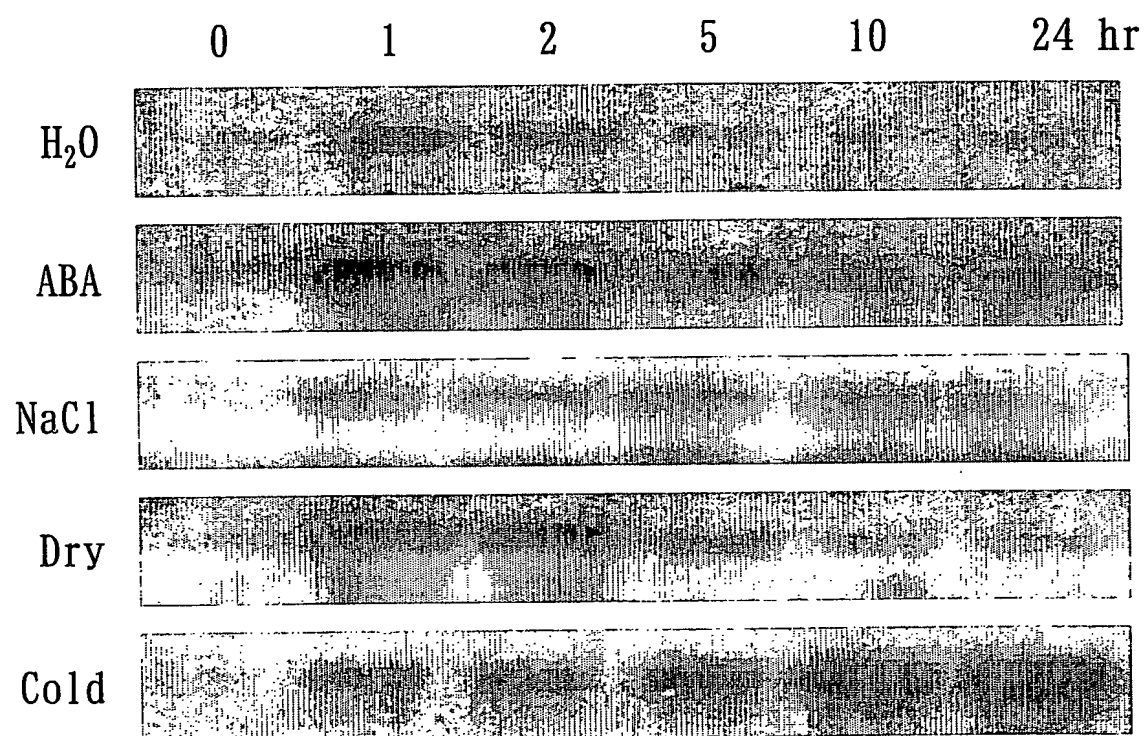
5 配列番号 1 2 ー人工配列の説明：プライマー

## 請 求 の 範 囲

1. 以下の(a)又は(b)の DNA からなる、イネ由来のプロモーター。
  - (a) 配列番号 1 又は配列番号 10 で表される塩基配列からなる DNA
  - 5 (b) 配列番号 1 又は配列番号 10 で表される塩基配列からなる DNA に相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつストレス誘導性プロモーター活性を有する DNA
2. 前記ストレスが乾燥ストレス、低温ストレス又は塩ストレスである請求項 1 記載のプロモーター。
- 10 3. 請求項 1 又は 2 記載のプロモーターを含む組換えベクター。
4. 請求項 1 又は 2 記載のプロモーター支配下にさらにストレス耐性を向上させる構造遺伝子及び／又は調節遺伝子を機能しうる態様で含む、請求項 3 記載のベクター。
5. ストレス耐性を向上させる構造遺伝子及び／又は調節遺伝子がプロ  
15 リン合成の鍵酵素 P5CS 遺伝子、ガラクトキノール合成遺伝子 AtGalS3 遺伝子、シロイヌナズナ由来転写因子 DREB 遺伝子、イネ由来転写因子 OsDREB 遺伝子、及び ABA 合成酵素 NCED 遺伝子から選ばれる、請求項 4 記載のベクター。
6. ストレス耐性を向上させる構造遺伝子及び／又は調節遺伝子がイネ由来転写因子 OsDREB 遺伝子である、請求項 5 記載のベクター。
- 20 7. 請求項 3～6 のいずれか 1 項に記載のベクターを宿主に導入して得られる形質転換体。
8. 宿主が植物である、請求項 7 記載の形質転換体。
9. 宿主が単子葉植物である、請求項 8 記載の形質転換体。
10. 請求項 1 又は 2 記載のプロモーターを植物に導入することにより、  
25 該植物のストレス耐性を向上させる方法。

## 図 1

a0022 (LIP9)

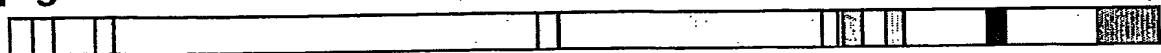


## 図 2

## LIP 9

|                                  |  |   |                            |  |                                      |
|----------------------------------|--|---|----------------------------|--|--------------------------------------|
| TCATCAGCTA <sup>10</sup>         | TCATCAAAGC <sup>20</sup>                     | GAAGGAAAGA <sup>30</sup>                    | AAGAAAAATA <sup>40</sup>   | AAAGGAAAAAG <sup>50</sup>                    | AACTGGCTGG <sup>60</sup>             |
| AAATTAGAGA <sup>70</sup>         | AGCCCCGGAC <sup>80</sup>                     | GACTCGATCT <sup>90</sup>                    | GGGGGTGGCA <sup>100</sup>  | AATTAATCAG <sup>110</sup>                    | TGTGATCAAC <sup>120</sup> <b>Myb</b> |
| <u>AGGGATAACT</u> <sup>130</sup> | TATCCCGTCC <sup>140</sup>                    | GACCAAATCC <sup>150</sup>                   | ACCAACCAAA <sup>160</sup>  | CCAAGACCCG <sup>170</sup>                    | ATTGTGTAGG <sup>180</sup>            |
| CTGTGAAAGA <sup>190</sup>        | CGGATCAGTG <sup>200</sup>                    | GGACCCTGAT <sup>210</sup>                   | CTACGGACCC <sup>220</sup>  | <u>CATATGTCAC</u> <sup>230</sup> <b>Myc</b>  | CGTCCAGGTC <sup>240</sup>            |
| TCTGGATCTC <sup>250</sup>        | TCCCGTCGTC <sup>260</sup>                    | CTAATCAGAC <sup>270</sup>                   | ACCGCGCGCG <sup>280</sup>  | CGGTGCCGTC <sup>290</sup>                    | GCTCTCGAGC <sup>300</sup>            |
| CGTGTCCCGC <sup>310</sup>        | TCCCAACTCG <sup>320</sup>                    | TCACAAAAGC <sup>330</sup>                   | GATCACAGAC <sup>340</sup>  | TCTTCCTTCC <sup>350</sup>                    | TCTGCTGGGA <sup>360</sup>            |
| GAGAAGAAAA <sup>370</sup>        | ATTGGCCGCG <sup>380</sup>                    | ATGATGCCGA <sup>390</sup>                   | TAAAGAGGAA <sup>400</sup>  | AAAGGGATGA <sup>410</sup>                    | GAATCCGATG <sup>420</sup>            |
| GAAAAAAACT <sup>430</sup>        | GATGTTAATC <sup>440</sup>                    | TATCGCTACT <sup>450</sup>                   | GCTGCGCACT <sup>460</sup>  | AAGACGAATC <sup>470</sup>                    | GTATCCGAAC <sup>480</sup>            |
| AAGAAACGCT <sup>490</sup>        | TACGTTACTG <sup>500</sup>                    | TTCCTAAATG <sup>510</sup>                   | GATCGCTCCG <sup>520</sup>  | CTCATCACTT <sup>530</sup>                    | AACCAAAAAAT <sup>540</sup>           |
| CGATTAGGAA <sup>550</sup>        | ATTGACGGAC <sup>560</sup>                    | AGCGACGCCC <sup>570</sup>                   | GAAGCCAAGT <sup>580</sup>  | <u>GTCTCGTCGC</u> <sup>590</sup> <b>Myc</b>  | GTAGGCGTCG <sup>600</sup>            |
| AGGCCTCGAA <sup>610</sup>        | GCAGAGGGAG <sup>620</sup>                    | CGGAGAGGCG <sup>630</sup>                   | GACGCGCCGC <sup>640</sup>  | CCACGCCTCC <sup>650</sup>                    | TCTCCCTCGG <sup>660</sup>            |
| TGACACGGCC <sup>670</sup>        | GTCTGGCTCC <sup>680</sup>                    | <u>ACATGGCGCC</u> <sup>690</sup> <b>Myc</b> | GACCTCTCCC <sup>700</sup>  | GATGCGTCCA <sup>710</sup>                    | CCCGTCCCGA <sup>720</sup>            |
| GGCACCGCCA <sup>730</sup>        | CGTCGGAACC <sup>740</sup>                    | AGCCGGCCCG <sup>750</sup>                   | CCCACGCGAT <sup>760</sup>  | <u>TGCCGACACG</u> <sup>770</sup> <b>DRE</b>  | CGTCGCGGCG <sup>780</sup>            |
| CCACTGGCTC <sup>790</sup>        | ACCCGCTGCC <sup>800</sup>                    | TGCCTCTGCC <sup>810</sup>                   | TGCCCCCAT <sup>820</sup>   | CTCGTCGCCA <sup>830</sup>                    | TTTCCCGCCC <sup>840</sup>            |
| ACGCTTCTTG <sup>850</sup>        | TCCTCGCGTC <sup>860</sup>                    | GCCTACGCGT <sup>870</sup>                   | ACGTACGATA <sup>880</sup>  | CAAACGCCGC <sup>890</sup>                    | ACCTTTTCGAT <sup>900</sup>           |
| CCCCTCCGCT <sup>910</sup>        | <u>ATATAAGGAG</u> <sup>920</sup> <b>TATA</b> | GGCATCTGCC <sup>930</sup>                   | TCGCCACCTT <sup>940</sup>  | CTTCATCCGA <sup>950</sup>                    | AAGCAAAAAGC <sup>960</sup>           |
| GACTCGTCAC <sup>970</sup>        | AGCTCAAAACA <sup>980</sup>                   | AGTCAAGAGC <sup>990</sup>                   | GAATAGTTCT <sup>1000</sup> | TGCTGATCTG <sup>1010</sup>                   | TTGTTTGATT <sup>1020</sup>           |
| ACTTTAGTTC <sup>1030</sup>       | TCGAGAGGCT <sup>1040</sup>                   | TTAGCTGAAT <sup>1050</sup>                  | CCATCGATCA <sup>1060</sup> | <u>TGGAGGATGA</u> <sup>1070</sup> <b>ORF</b> | GAGGAACA <sup>1080</sup>             |

## LIP 9



DRE (A/ GCCGAC)
  Myb
  Myc
  TATA

図 3

LIP 9:Gus コンストラクト

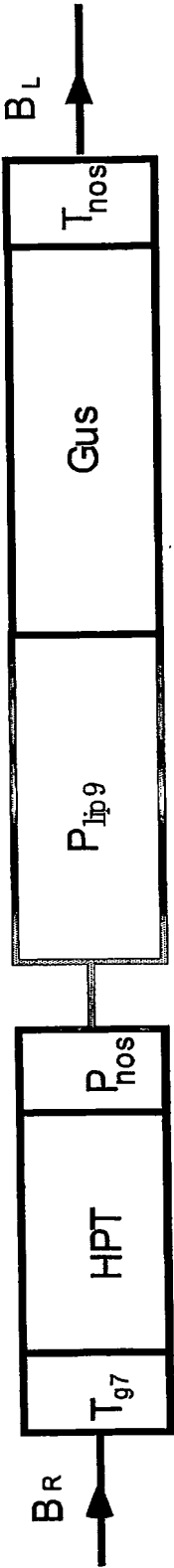


図 4

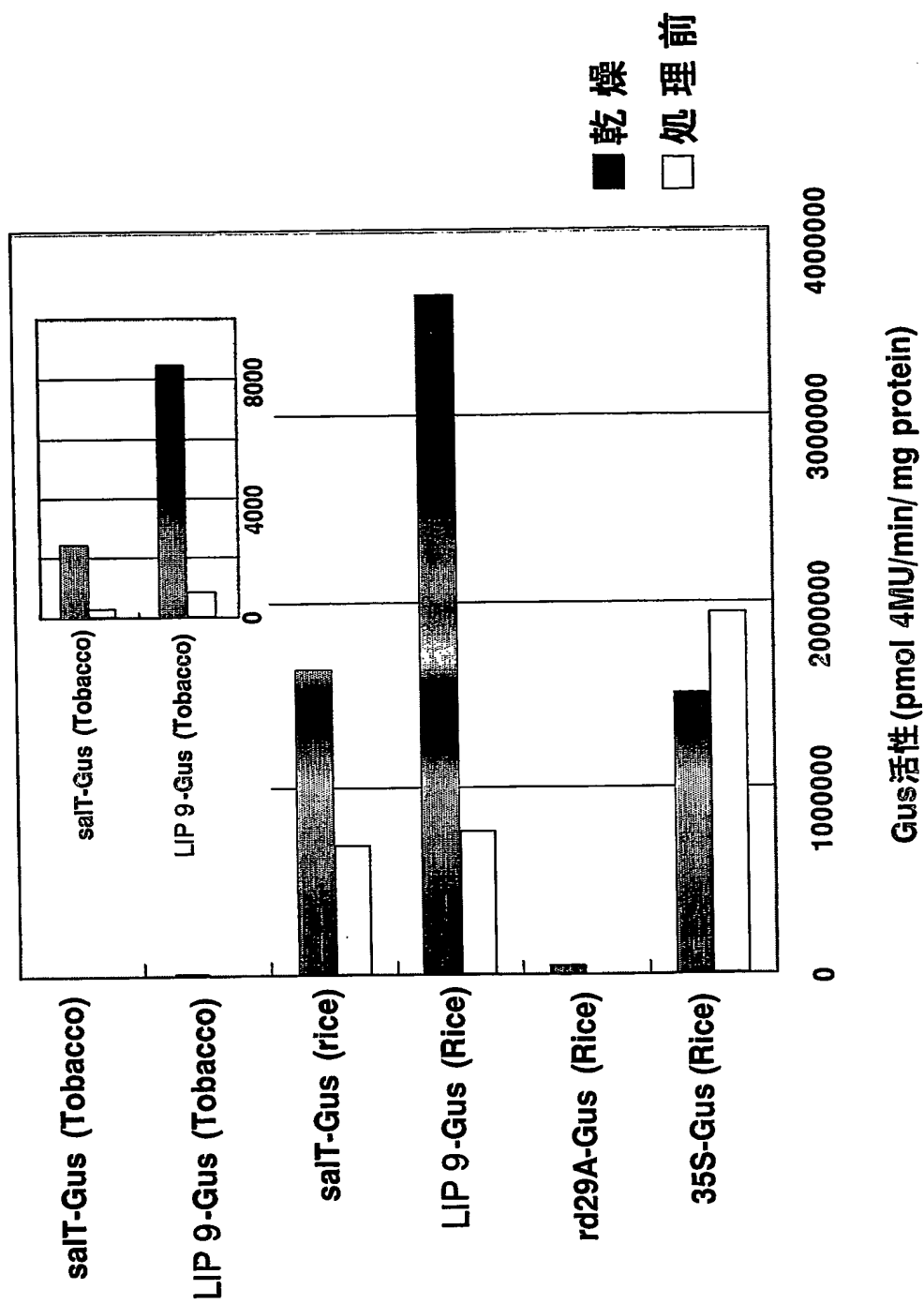
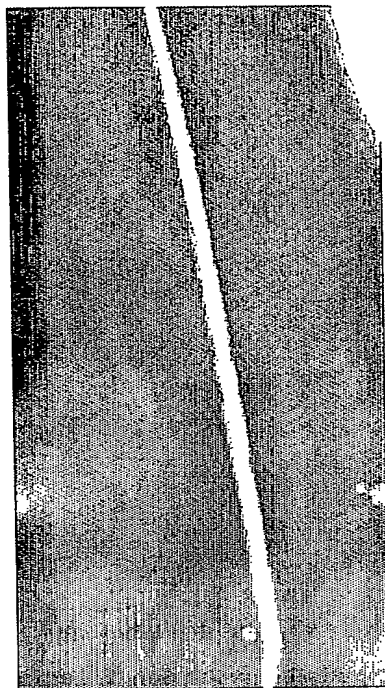
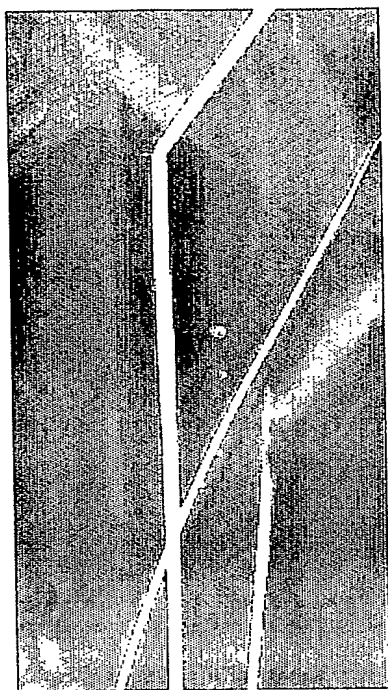
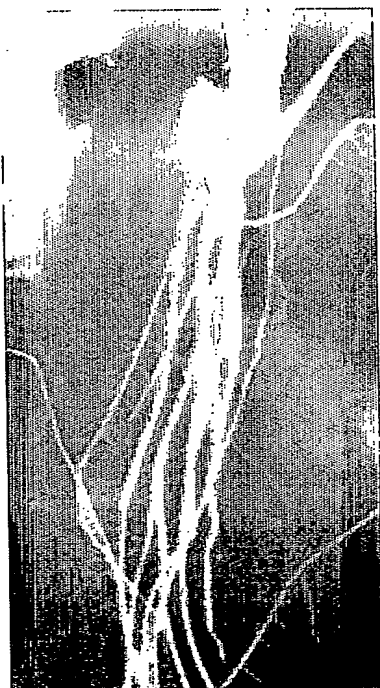


図 5

葉



根



control

塩処理



図6

野生株 OsDREB1A OsDREB1A ユビキチン: 35S: ユビキチン:  
野生株 DREB1C

a b c a b a b

導入遺伝子

a0022  
(LIP9)

a0066  
(WSI)

a2660  
(salt)



## 図 7

WSI724

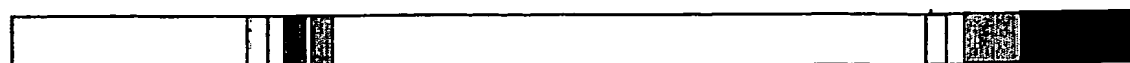
```

10      20      30      40      50      60
AGCCGTGGAAGTCCAACCTGCAGGCTCAGGCTGCAGATCGCCCAAGGCGCACTTGCCTCC
70      80      90      100     110     120
ACGATGGCTTGTCTCAACCGCTCGGAAGGCGAGATCCAATTGGCAATTTGTTCAACGCA
130     140     150     160     170     180
GGGAGAGAGGAGGAGACTGGAACGGGATCATTGGACATTGGTTGATGAATTGCAATTTGG
190     200     210     220     230     240
ATGACGAGGCCGCGAGGGTCAGACCGTCGGAGAGTGAGATGATGGTTATACAAGTGTAAT
250     260     270     280     290     300
AGTAGGACGGACGGTGGCACCGGCCAGAAGCAGCAGATTTTGTGCAAACGTTGAGCCCGC
310     320     330     340     350     360
AACACGTGGCCGGCATCGACCCGCTACGACGGACGCGAGCGCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
370     380     390     400     410     420
GCGGACCCACGCGGGCCGGCCGCGCTGTCGCCGTGCTGCCGACTACGCCGTCGAAATCAA
430     440     450     460     470     480
CGCGTCCGCTCGATCCTCCCTGCCGAGCTGTACAAGTGCGGACCAAGAAAACACCATG
490     500     510     520     530     540
TAGTATTTGATCTCGTCTAAGAGCAAGTTTAATACTATAGTCCACTATTAGCTCCAATTT
550     560     570     580     590     600
ATTTATAACTGATCTAATAGCCAATTCACACAATAATTGCTTACTATACTATTAATATAT
610     620     630     640     650     660
GGTCTCATATGTCATACACATATTCGGTCTTGGAGTTTCGTGCTGCAGCTGGCTACAGATC
670     680     690     700     710     720
TGTAGCCCGCTGCTCTTCTCTCAGAGCGAGTATAATAGTACAAACTGGACTGGCGATA
730     740     750     760     770     780
GGAGAAACACGTCAGCTACAGTGTTGAGCTGGATGAGTGAGAAGAGGAGAGAGAGTGAGA
790     800     810     820     830     840
GTGGGCGACAATTTTATCGCCGGCTCTAGCACCAGCTTCGAGAGAAAAGTGGTGAGCGCA
850     860     870     880     890     900
GAGGTTGTGAGCTGCATGTGTGAGACGAAGCTTAAGTTATTTTATTATGATGTGAAGTTG
910     920     930     940     950     960
ATGGGTCCAGCGTTGCAGGTCATTTATTGATTACAAAGATGCAAAGAGAGCTACTAGCT
970     980     990     1000    1010    1020
GAGTTGGATGGAATTAACGCCGGCTGTCTACGCTACTATTAACCTTGCTCTCATCTTTTA
1030    1040    1050    1060    1070    1080
TCTCATCAAAATATATTTATAGCTGGCTAATAGTCTGCTATCGTACCTGCTCTAATGCAT
1090    1100    1110    1120    1130    1140
ACGTTTTTCTCTCTGTGGCAAAACGGTTGGTGCGTTACACGGGGTGACGAAGCCATGC
1150    1160    1170    1180    1190    1200
ATCACCTGCTCAACCCGTCCTCTTTTATAGCCTAATCTTTTCTCTCTTATCCGATGGGC
1210    1220    1230    1240    1250    1260
CTTCCGTTTCTCAAGACACCCCCACACCGCCCGGCCCTCTATAAATACCAACCACGACG
1270    1280    1290    1300    1310    1320
AGCCAAGCGAACATCAACACAGCTAGATCATTAGCAATCCATTCCGATCCATCAAATTTT
1330    1340    1350    1360
TCTTGAGACCGTAGAGAGAGAGAGAGGCGCCAACCATGGCCGGCATC

```

ABRE (370-380)  
 DRE (430-440)  
 DRE (510-520)  
 TATA (1270-1280)  
 FLcDNA (1340-1350)  
 ORF (1360-1370)

WSI724



■ DRE(A/GCCGAC)    □ ABRE(ACGTGG/T)    ▨ TATA box

▤ cDNA

■ ORF

8

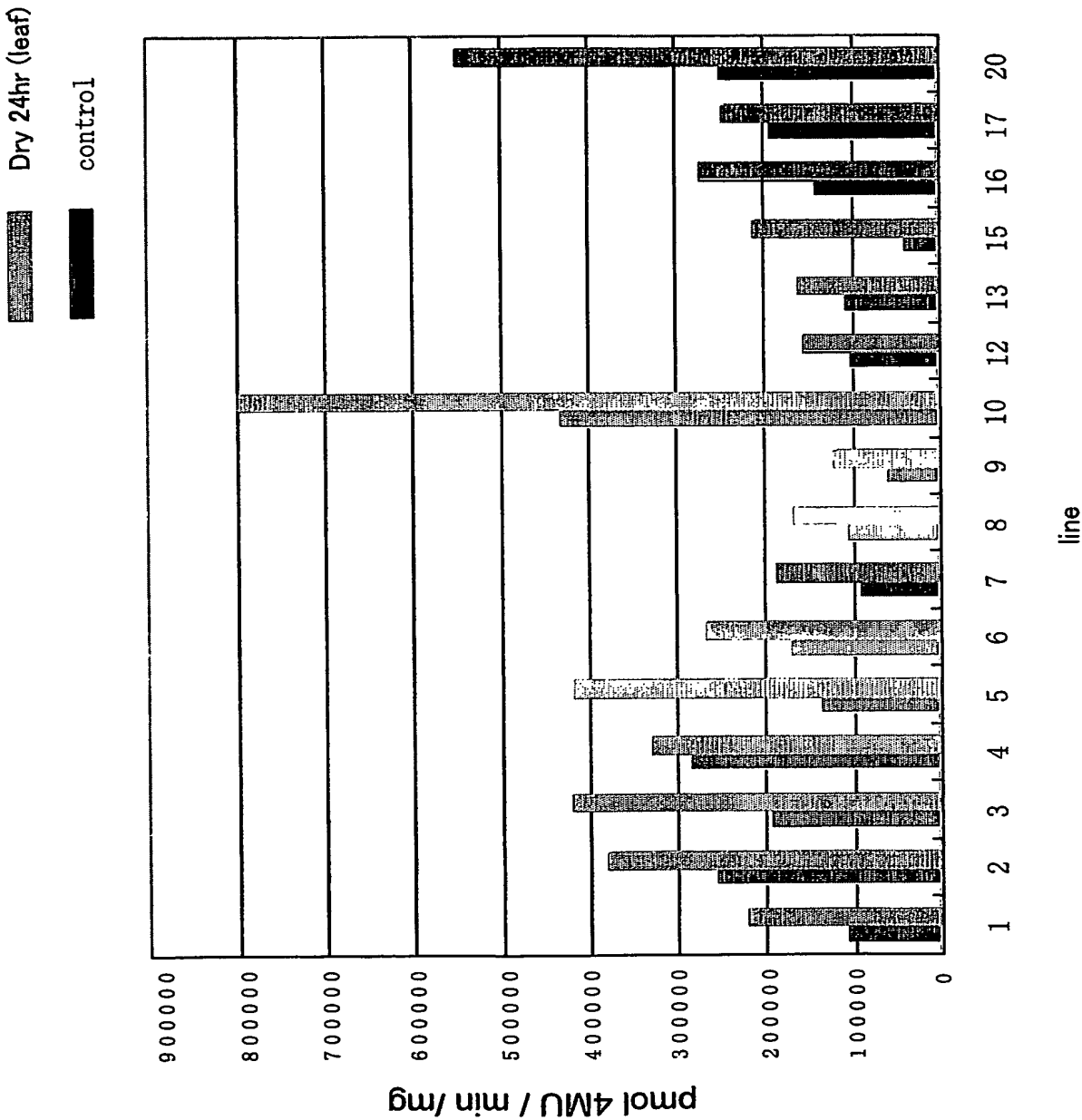
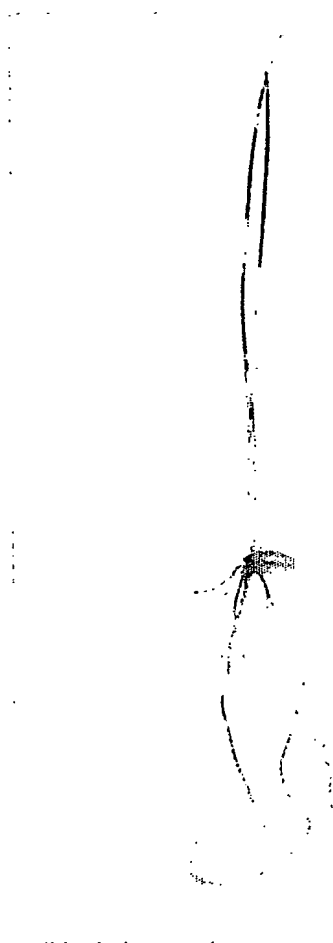


図 9



## SEQUENCE LISTING

<110> Japan International Research Center for Agricultural Sciences  
 Incorporated Administrative Agency, National Agriculture and Bio-oriented Research Organization

<120> Stress Inducible Promoter and Its Uses

<130> PH-2004-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2003-80847

<151> 2003-03-24

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1066

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<223> Inventor: Shinozaki, Kazuko; Katsura, Koji; Ito, Yusuke

<400> 1

```

tcatacagcta tcatacaagc gaaggaaaga aagaaaaata aaaggaaaag aactggctgg 60
aaattagaga agccccggac gactcgatct gggggtggca aattaatcag tgtgatcaac 120
agggataact tatcccgctc gaccaaattc accaaccaaa ccaagaccgc atttgtagg 180
ctgtgaaaga cggatcagtg ggaccctgat ctacggaccc catatgtcac cgtccaggtc 240
tctggatctc tcccgctgct ctaatcagac accgcgcgcg cgggtgccgc gctctcgagc 300
cgtgtcccg cccaactcg tcacaaaagc gatcacagac tcttccttcc tctgctggga 360
gagaagaaaa attggccgcg atgatgccga taaagaggaa aaagggatga gaatccgatg 420
gaaaaaaact gatgttaatc tatcgctact gctgcgcact aagacgaatc gtatccgaac 480
aagaaacgct tacgttactg ttctctaatg gatcgctccg ctcatcactt aacaaaaaat 540
cgattaggaa attgacggac agcgacgcc gaagccaagt gtctcgtcgc gtaggcgtcg 600
aggcctcgaa gcagagggag cggagaggcg gacgcgcgc ccacgcctcc tctccctcgg 660
tgacacggcc gtctggctcc acatggcgcc gacctctccc gatgcgtcca cccgtcccga 720
ggcaccgcca cgctcggaacc agccggccgc cccacgcgat tgccgacacg cgtcgcggcg 780

```

ccactggctc acccgctgcc tgcctctgcc tgccecccat ctctcgcca ttcccgccc 840  
 acgtttcttg tctcgcgtc gcctacgct acgtacgata caaacgccgc acctttcgt 900  
 cccctccgct atataaggag ggcatctgcc tgcaccctt cttcatccga aagcaaaagc 960  
 gactcgtcac agtcaaaca agtcaagagc gaatagtict tgctgatctg ttgtttgatt 1020  
 actttagttc tcgagaggct ttagctgaat ccatcgatcg aggatg 1066

<210> 2

<211> 1245

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 2

gctagcagag ctctgcacag ctcaaacaag tcaagagcga atagtcttg ctgatctgtt 60  
 gtttgattac tttagtctc gagaggctt agctgaatcc atcgatcgat catggaggat 120  
 gagaggaaca cggagagcca ccagggtggc gaggtgcag agcaggtgga ggtgaaggac 180  
 aggggcctct tcgacaacct cttggcagg aagaaggacg atcagccgga ggagaagaag 240  
 catgaggagg agcttgcac cggcatggag aaggtctccg tggaagagcc aaagaaggag 300  
 gagcaccacg ccgagggcga gaagaaggag agcctcctct ccaagctgca ccgatccagc 360  
 tccagctcca gctcgtcgag tgataggaa gaggaggta tcgatgaca cggcgaggta 420  
 gtcaagagga agaagaagaa ggggtcaag gagaagatca aggagaagct gcccggccac 480  
 aaggaccatg ccggtgagca tgcctcctc ccccgggcga cgggttccc gcgccggctc 540  
 cgctgcatcc gtggtgacgg ccgcgccac gccactcctg ctcccggtgt gactcacggc 600  
 gatcaccacc acgacaccgc cgtccccgtg gaaaagatcg aggtgatca cgccagacgg 660  
 aggcgaccct gccacgtgca cccgaggagg aaaaagggc ttcctcgaca agatcaagga 720  
 gaagctgccc ggcgccaca agaagccgga agacgcaact gctgtgccgc cgccggccgc 780  
 ctaccggct gctctgcca ctactccggc gccagcacac ccaccgccg ctacagagga 840  
 agtgagcagc ccggtaggga aggagaagaa ggttactg ggcaagatca tggagaaact 900  
 gcccggttac cacaagggt ccgcgagga agacaagacc gccgcccg ccaccggcga 960  
 gcacaagagc agcgcttaat tggggcgtgt gtgagaccag gccatggtt gaatttgga 1020  
 gtgtttggcg tgtttagt ttgtgttt tctgcactgc agctttgtta agttcgtgtc 1080  
 aagattggc aaggcctgt cagcgaagcc cgatcagtga tcgaagttt gtttcgtgt 1140  
 ggggtacggg cttcagttt ctatagtaa gtactagatg ttgagttgt ttaattatta 1200  
 ttggcactct tgtattggt ttgggtggg cattctgcct tggta 1245

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

cacgaagcctt tcacagccta ttcatcaa

28

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

ccggatcctc gatcgaigga ttacgcta

28

<210> 5

<211> 1608

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 5

caacaaccac tactgaacac ggctaagtgt gtttcctctc ctccaagatg tcgttattgc 60  
gttcctttct gctattccat acatatcaat ctctagagga acaccttact ctagctttca 120  
gacaagggac ggtggtaaat cacgtcgtat cctccatggg gtgtgctccg aaaaaccttc 180  
cctcatgcat tagagatcat gggtaggaatt tagcgaigga acaccttatt tataatttag 240  
ttactctccg gcggatccat ctgcttccgt ttgttgatcg atgctggcga tgatgtgtgt 300  
gagtatcgat caacagaatg atcggacgct atttttgggg tcgttttttt tcagcattga 360  
ggagggatga ggatigcttg caacatgcag gtgctgctca aaacaacggt taagcagata 420  
tccgtcaatt tgatagtaag atctgtaacg cgtggctctt cgagctgaaa actatggact 480  
ctttgaaaca aagataatat tatattaaat tctattattc aaagatatct aaatatttag 540  
aaagatatta ataatgttat taaactttga cttacttaaa acaagtccaa aacigcatgt 600  
ccctaatacg ccagaagata aggaacacct gtaccctgta taacagaggg gtatgaaatt 660  
tggacacgag gcttcttttg cagacgtggc gctgagtgag cttggctcgc ttggtcaaac 720  
tccgtgcagg gacattcagt tagctagcta gcagcatgtg cgacaataag atagccttta 780  
aatgttagca ctaccagct tgtcaaaaac caaggcttgg tgacggcggc ttcagaatga 840  
aggatagatg gataaatgtc tagaatatta taaagtccaa caaaagatgg agcacatgca 900  
tgaaagatta cgtacacgaa tgcagttgat acagtggatg ttaggcataa gaagcactat 960  
aaatagaggg tgcaatcccc attgccctac acaactacac aagtcgacta tcattacaag 1020  
gaaatttaag cgaccacgaa ggtatgaaag catagcagta ctctgcattt ttttttttg 1080

```

atgttgttct agctagctct gcttaagggtt ttcctttctt tcgttctttg ttttttttt 1140
gtaagctcaa ctagttagcat gcaatttaga tttatcctt ttacagttagg aaaaacatcc 1200
ctataaatat taccatgaat gcatagagat tcgaggaagc tacaatttg acgactgatt 1260
ccaaaaaaaa aaaaaaaatc agatgggtcac atcattgcta ttgttttggt aaagtacaaa 1320
agcacctggt cggattcaaa ttacttgtgc aaattaattia aaaacatag aaatgatcat 1380
gttaccacct cacatttcgg aaacaatacc atatatgtta gtgtgcgac attcaaattg 1440
atttatatct gaacaaaact gagtgggaat acggtgagca aacttgacga ttccaaaata 1500
atttatattt aggcaaaatt ttacaacttc aaagttcaaa caagctaacc tgaaaaatca 1560
tgtttgaatt tactaagatg tgcttttgta ttactaaac agagtatg 1608

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 927

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (69).. (782)

&lt;400&gt; 6

CACACTCGAG CAGAGCAAAT ACAGTTCAGG AATCAGGAGC AAGCAGAAAC ACACACACAA 60

ATCCGAAG ATG TGC GGG ATC AAG CAG GAG ATG AGC GGC GAG TCG TCG GGG 110  
Met Cys Gly Ile Lys Gln Glu Met Ser Gly Glu Ser Ser Gly  
1 5 10

TCG CCG TGC AGC TCG GCG TCG GCG GAG CGG CAG CAC CAG ACG GTG TGG 158  
Ser Pro Cys Ser Ser Ala Ser Ala Glu Arg Gln His Gln Thr Val Trp  
15 20 25 30

ACG GCG CCG CCG AAG AGG CCG GCG GGG CGG ACC AAG TTC AGG GAG ACG 206  
Thr Ala Pro Pro Lys Arg Pro Ala Gly Arg Thr Lys Phe Arg Glu Thr  
35 40 45

AGG CAC CCG GTG TTC CGC GGC GTG CGG CGG AGG GGC AAT GCC GGG AGG 254  
Arg His Pro Val Phe Arg Gly Val Arg Arg Arg Gly Asn Ala Gly Arg  
50 55 60

TGG GTG TGC GAG GTG CGG GTG CCC GGG CGG CGC GGC TGC AGG CTC TGG 302  
Trp Val Cys Glu Val Arg Val Pro Gly Arg Arg Gly Cys Arg Leu Trp  
65 70 75



CTC GGC ACG TTC GAC ACC GCC GAG GGC GCG GCG CGC GCG CAC GAC GCC 350  
 Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Glu Gly Ala Ala Arg Ala His Asp Ala  
           80                          85                          90

GCC ATG CTC GCC ATC AAC GCC GGC GGC GGC GGC GGC GGG GGA GCA TGC 398  
 Ala Met Leu Ala Ile Asn Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Cys  
           95                          100                          105                          110

TGC CTC AAC TTC GCC GAC TCC GCG TGG CTC CTC GCC GTG CCG CGC TCC 446  
 Cys Leu Asn Phe Ala Asp Ser Ala Trp Leu Leu Ala Val Pro Arg Ser  
                           115                          120                          125

TAC CGC ACC CTT CGC CGA CGT CCG CCA CGC CGT GCC GAG GCC GTC GAG 494  
 Tyr Arg Thr Leu Arg Arg Arg Pro Pro Arg Arg Ala Glu Ala Val Glu  
                           130                          135                          140

GAC TTC TTC CGG CGC CGC CTC GCC GAC GAC GCG CTG TCC GCC ACG TCG 542  
 Asp Phe Phe Arg Arg Arg Leu Ala Asp Asp Ala Leu Ser Ala Thr Ser  
                           145                          150                          155

TCG TCC TCG ACG ACG CCG TCC ACC CCA CGC ACC GAC GAC GAC GAG GAG 590  
 Ser Ser Ser Thr Thr Pro Ser Thr Pro Arg Thr Asp Asp Asp Glu Glu  
           160                          165                          170

TCC GCC GCC ACC GAC GGC GAC GAG TCC TCC TCC CCG GCC AGC GAC CTG 638  
 Ser Ala Ala Thr Asp Gly Asp Glu Ser Ser Ser Pro Ala Ser Asp Leu  
           175                          180                          185                          190

GCG TTC GAA CTG GAC GTC CTG AGT GAC ATG GGC TGG GAC CTG TAC TAC 686  
 Ala Phe Glu Leu Asp Val Leu Ser Asp Met Gly Trp Asp Leu Tyr Tyr  
                           195                          200                          205

GCG AGC TTG GCG CAG GGG ATG CTC ATG GAG CCA CCA TCG GCG GCG CTC 734  
 Ala Ser Leu Ala Gln Gly Met Leu Met Glu Pro Pro Ser Ala Ala Leu  
                           210                          215                          220

GGC GAC GAC GGT GAC GCC ATC CTC GCC GAC GTC CCA CTC TGG AGC TAC 782  
 Gly Asp Asp Gly Asp Ala Ile Leu Ala Asp Val Pro Leu Trp Ser Tyr  
           225                          230                          235

TAGAGCTCAA TCAACTGTAC AATTTTGCCT CTTTTTCTC TCTTTTCTGG CTTCCGATGC 842  
 CAAAATTTTG GTACTGTACG GACACTACTT TCGGTAATGT GATGGAACAA GTTGCAAAAC 902  
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA 927

<210> 7

<211> 1437

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

<222> (167).. (1171)

<400> 7

gctgtctgat aaaaagaaga ggaaactcg aaaaagctac acacaagaag aagaagaaaa 60  
 gatacgagca agaagactaa acacgaaagc gatttatcaa ctggaaggaa gagactttga 120  
 ttttcaaatt tcgtcccta tagatttgtg tgtttctggg aaggag atg gca gtt 175  
 Met Ala Val  
 1  
 tat gat cag agt gga gat aga aac aga aca caa att gat aca tcg agg 223  
 Tyr Asp Gln Ser Gly Asp Arg Asn Arg Thr Gln Ile Asp Thr Ser Arg  
 5 10 15  
 aaa agg aaa tct aga agt aga ggt gac ggt act act gtg gct gag aga 271  
 Lys Arg Lys Ser Arg Ser Arg Gly Asp Gly Thr Thr Val Ala Glu Arg  
 20 25 30 35  
 tta aag aga tgg aaa gag tat aac gag acc gta gaa gaa gtt tct acc 319  
 Leu Lys Arg Trp Lys Glu Tyr Asn Glu Thr Val Glu Glu Val Ser Thr  
 40 45 50  
 aag aag agg aaa gta cct gcg aaa ggg tcg aag aag ggt tgt atg aaa 367  
 Lys Lys Arg Lys Val Pro Ala Lys Gly Ser Lys Lys Gly Cys Met Lys  
 55 60 65  
 ggt aaa gga gga cca gag aat agc cga tgt agt ttc aga gga gtt agg 415  
 Gly Lys Gly Gly Pro Glu Asn Ser Arg Cys Ser Phe Arg Gly Val Arg  
 70 75 80  
 caa agg att tgg ggt aaa tgg gtt gct gag atc aga gag cct aat cga 463  
 Gln Arg Ile Trp Gly Lys Trp Val Ala Glu Ile Arg Glu Pro Asn Arg  
 85 90 95  
 ggt agc agg ctt tgg ctt ggt act ttc cct act gct caa gaa gct gct 511  
 Gly Ser Arg Leu Trp Leu Gly Thr Phe Pro Thr Ala Gln Glu Ala Ala  
 100 105 110 115  
 tct gct tat gat gag gct gct aaa gct atg tat ggt cct ttg gct cgt 559

Ser Ala Tyr Asp Glu Ala Ala Lys Ala Met Tyr Gly Pro Leu Ala Arg  
 120 125 130  
 ctt aat ttc cct cgg tct gat gcg tct gag gtt acg agt acc tca agt 607  
 Leu Asn Phe Pro Arg Ser Asp Ala Ser Glu Val Thr Ser Thr Ser Ser  
 135 140 145  
 cag tct gag gtg tgt act gtt gag act cct ggt tgt gtt cat gtg aaa 655  
 Gln Ser Glu Val Cys Thr Val Glu Thr Pro Gly Cys Val His Val Lys  
 150 155 160  
 aca gag gat cca gat tgt gaa tct aaa ccc ttc tcc ggt gga gtg gag 703  
 Thr Glu Asp Pro Asp Cys Glu Ser Lys Pro Phe Ser Gly Gly Val Glu  
 165 170 175  
 ccg atg tat tgt ctg gag aat ggt gcg gaa gag atg aag aga ggt gtt 751  
 Pro Met Tyr Cys Leu Glu Asn Gly Ala Glu Glu Met Lys Arg Gly Val  
 180 185 190 195  
 aaa gcg gat aag cat tgg ctg agc gag ttt gaa cat aac tat tgg agt 799  
 Lys Ala Asp Lys His Trp Leu Ser Glu Phe Glu His Asn Tyr Trp Ser  
 200 205 210  
 gat att ctg aaa gag aaa gag aaa cag aag gag caa ggg att gta gaa 847  
 Asp Ile Leu Lys Glu Lys Glu Lys Gln Lys Glu Gln Gly Ile Val Glu  
 215 220 225  
 acc tgt cag caa caa cag cag gat tgc cta tct gtt gca gac tat ggt 895  
 Thr Cys Gln Gln Gln Gln Gln Asp Ser Leu Ser Val Ala Asp Tyr Gly  
 230 235 240  
 tgg ccc aat gat gtg gat cag agt cac ttg gat tct tca gac atg ttt 943  
 Trp Pro Asn Asp Val Asp Gln Ser His Leu Asp Ser Ser Asp Met Phe  
 245 250 255  
 gat gtc gat gag ctt cta cgt gac cta aat ggc gac gat gtg ttt gca 991  
 Asp Val Asp Glu Leu Leu Arg Asp Leu Asn Gly Asp Asp Val Phe Ala  
 260 265 270 275  
 ggc tta aat cag gac cgg tac ccg ggg aac agt gtt gcc aac ggt tca 1039  
 Gly Leu Asn Gln Asp Arg Tyr Pro Gly Asn Ser Val Ala Asn Gly Ser  
 280 285 290  
 tac agg ccc gag agt caa caa agt ggt ttt gat ccg cta caa agc ctc 1087  
 Tyr Arg Pro Glu Ser Gln Gln Ser Gly Phe Asp Pro Leu Gln Ser Leu  
 295 300 305  
 aac tac gga ata cct ccg ttt cag ctc gag gga aag gat ggt aat gga 1135  
 Asn Tyr Gly Ile Pro Pro Phe Gln Leu Glu Gly Lys Asp Gly Asn Gly  
 310 315 320  
 ttc ttc gac gac ttg agt tac ttg gat ctg gag aac taaacaaaac 1181  
 Phe Phe Asp Asp Leu Ser Tyr Leu Asp Leu Glu Asn  
 325 330 335  
 aatatgaagc tttttggatt tgatatattgc cttaatccca caacgactgt tgattctcta 1241

tccgagtttt agtgatatag agaactacag aacacgtttt tttctgttat aaaggtgaac 1301  
 tgtatataatc gaaacagtga tatgacaata gagaagacaa ctatagtttg ttagtctgct 1361  
 tctcttaagt tgttcttttag atatgtttta tgttttgtaa caacaggaat gaataatata 1421  
 cacttgtaaa aaaaaa

<210> 8  
 <211> 353  
 <212> DNA  
 <213> Oryza sativa

<400> 8  
 gctagcagag tagcaatcca ttccgatcca tcaaatttct cttgagaccg tagagagaga 60  
 gagaggcgcc aaccaatggcc ggcatcatcc acaagatcga ggagaagctc cacatgggcg 120  
 gaggcgagca caagaaggaa gacgagcaca agaaggaggg ggagcaccac aagaaggacg 180  
 gggagcaciaa ggaaggcgtg gtggagaaga tcaaggacaa gatcaccggc gaccacggcg 240  
 acggcggcgca gcacaaggag aagaaggaca agaagaagaa gaaggagaag aagcacggcg 300  
 aggagggcca ccaccacgac ggccacagca gcagcagcag cgacagcgac tgg 353

<210> 9  
 <211> 545  
 <212> DNA  
 <213> Oryza sativa

<400> 9  
 cgactatcat tacaaggaat ttttaagcgac cacgaagagt atgacgctgg tgaagattgg 60  
 tccgtggggc ggaaatggag ggtcagctca ggacatcagt gtgccacca agaagctgtt 120  
 aggcgtgaca atctacagct cagatgcaat cagatccatt gccttcaact acatcgggtg 180  
 ggatggacag gaatatgcc a ttgggtccatg ggggtggggc gaaggcacct ctacagagat 240  
 taaactgggc tcctctgagc agatcaagga gatttctgga acctatggcc cagtctatga 300  
 tctggctgac attgtcacct atcttaagat tgtgacaagt gctaataata catacgagcg 360  
 tggagtccca aatggaaagg aattcagcat tccactgcaa gactctggcc atgtcgttgg 420  
 attcttttga aggtctggaa cgcttatcga cgcaattggc atctacgtcc accttgatt 480  
 cccagtggtc aaagaattac tacctactac catatctacg aaataatgtt ccatggtgtt 540  
 gttgt 545

<210> 10  
 <211> 1357  
 <212> DNA  
 <213> Oryza sativa

&lt;400&gt; 10

```

agccgtggaa gtccaacctg caggctcagg ctgcagatcg cccaaggcgc acttgccctcc 60
acgatggctt gtcccaacc gctcggaagg cgagatccaa ttggcaattt gttcaacgca 120
gggagagagg aggagactgg aacgggatca ttggacattg gttgatgaat tgcaatttgg 180
atgacgaggc cgcgagggtc agaccgtcgg agagtgagat gatggttata caagtgtact 240
agtaggacgg acggtggcac cggccagaag cagcagattt tgtgcaaacg ttgagcccg 300
aacacgtggc cggcatcgac ccgtacacg gacgcagcgc cccccccccc ccccccccg 360
cggaccacg cgggccggcc gcgtgtcgc cgtgctgccg actacgccgt cgaaatcaac 420
gcgtccgctt cgatctccc ctgccgacgc tgtacaagtg gcgaccagaa aacaccatgt 480
agtatttgat ctctctaag agcaagtta atactatagt ccactattag ctccaattta 540
tttataactg atctaatagc caattcacac aataattgct tactatacta ttaatatatg 600
gtctcacatg tcatacacat attccgtctt ggagttcgtg ctgcagcigg ctacagatct 660
gtagcccgct gctcttctct ctgagagcga gtataatagt acaaactgga ctggcgatag 720
gagaaacacg tcagctacag tgttgagctg gatgagttag aagaggagag agagttagag 780
tgggcgacaa tttatcgcc ggctctagca ccagcttcga gagaaaagtg gtgagcgcag 840
aggttgttag ctgcatgtgt gagacgaagc ttaagttatt ttattatgat gtgaagtga 900
tgggtccagc gttgcaggtc atttattgta ttcacaagat gcaaagagag ctactagctg 960
agttaggatg aattaacgcc ggctgtctac gctactatta accttgctct catcttttat 1020
ctcatcaaaa tataattata gctggctaag agtctgctat cgtacctgct ctaatgcata 1080
cgttttttct ctctgtggca aaacggttgg tgcgttacac ggggtgcacg aagccatgca 1140
tcacctgct caaccgtct ctttttttag cctaattctt tcttcttat ccgatgggcc 1200
ttccgtttct caagacaccc ccacaccgcc ccggccctct ataaatacca accacgacga 1260
gccaaagcga catcaccaca gctagatcat tagcaatcca ttccgatcca tcaaatttct 1320
cttgagaccg tagagagaga gagaggcgcc aaccaig 1357

```

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer

&lt;400&gt; 11

ccattggatc cagccgtgga agtccaac

28

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

gccggggatc ctggcgccct ctctctct

28

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002563

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS, WPIDS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y1        | AGUAN, K. et al., Isolation of Genes for Low-Temperature-Induced Proteins in Rice by a Simple Subtractive Method, Plant Cell Physiol., 1991, Vol.32(8), pages 1285 to 1289     | 1-10                  |
| Y2        | JP 2000-116260 A (Director General of Japan International Resetry of Agriculture, Forestry and Fishes),<br>25 April, 2000 (25.04.00),<br>(Family: none)                        | 1-10                  |
| Y2        | JPSHEE, N. et al., Isolation and characterization of a water stress-specific genomic gene, pws1 18, from rice. Plant. Cell. Physiol., 1998, January, Vol.39(1), pages 64 to 72 | 1-10                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
14 May, 2004 (14.05.04)

Date of mailing of the international search report  
01 June, 2004 (01.06.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002563

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | LIU, Q. et al., Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. Plant.Cell., 1998 August, Vol.10(8), pages 1391 to 1406 | 1-10                  |
| A         | SHINOZAKI K. et al., Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. Plant.Physiol.1997, October, Vol.115(2), pages 327 to 334  | 1-10                  |



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/002563

**Box No. I** Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐

in written format

☒

in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐

contained in the international application as filed

☒

filed together with the international application in computer readable form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/002563

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The technical feature common to DNA consisting of the base sequence represented by SEQ ID NO:1 and DNA consisting of the base sequence represented by SEQ ID NO:10 resides in being rice-origin stress-induced promoters. However, a rice-origin stress-induced promoter had been publicly known before the application of the present case, as disclosed in JOSHEE, N et al., Plant Cell Physiol., vol.39(1), pp.64-72(1998). Thus, it does not appear that there is a technical relationship between DNA consisting of the base sequence represented by SEQ ID NO:1 and DNA consisting of the base sequence represented by SEQ ID NO:10 involving one or more of the same or corresponding special technical features. Such being the case, (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
The parts relating to SEQ ID NO:1 in the inventions as set forth in claims 1 to 10.

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002563

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

claims 1 to 10 of the present case have 2 groups of inventions, i.e., inventions having DNA consisting of the base sequence represented by SEQ ID NO:1 as the technical feature and inventions having DNA consisting of the base sequence represented by SEQ ID NO:10 as the technical feature.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>7</sup> C12N 15/00, A01H 5/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>7</sup> C12N 15/00, A01H 5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
BIOSIS, WPIDS

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| Y1              | AGUAN, K et al., Isolation of Genes for Low-Temperature-Induced Proteins in Rice by a Simple Subtractive Method. Plant Cell Physiol. 1991, vol. 32(8), pp. 1285-1289 | 1-10             |
| Y2              | JP 2000-116260 A (農林水産省国際農林水産業研究センター所長) 2000.04.25 (ファミリーなし)   | 1-10             |
| Y2              | JPSHEE, N et al., Isolation and characterization of a water stress-specific genomic gene, pws18, from rice. Plant Cell Physiol. 1998 Jan, vol. 39(1), pp. 64-72      | 1-10             |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.05.2004

国際調査報告の発送日

01.6.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長 井 啓 子

4 N

9 1 2 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                  |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A                     | LIU, Q et al., Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. Plant Cell. 1998 Aug, vol.10(8), pp.1391-1406 | 1-10             |
| A                     | SHINOZAKI, K et al., Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. Plant Physiol. 1997 Oct, vol.115 (2), pp.327-334  | 1-10             |

## 第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

配列番号1で表される塩基配列からなるDNAと配列番号10で表される塩基配列からなるDNAとに共通する技術的特徴は、イネ由来のストレス誘導性プロモーターである。しかしながら、イネ由来のストレス誘導性プロモーターはJOSHEE, N et al., Plant Cell Physiol., vol. 39(1), pp. 64-72 (1998)にも開示されているとおり、本願出願前に公知であるので、配列番号1で表される塩基配列からなるDNAと配列番号10で表される塩基配列からなるDNAとの間には一以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係があるとは認められない。よって、本願請求の範囲1-10には、配列番号1で表される塩基配列からなるDNAを特別な技術的特徴とする発明と、配列番号10で表される塩基配列からなるDNAを特別な技術的特徴とする発明の、計2発明が存在する。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲1-10に係る発明のうち配列番号1に関する部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。